

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOÇLARDA ÇİNKO TAKVİYELERİNİN PLAZMA
KİSSPEPTİN VE MELATONİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Halil HARMAN

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (VETERİNERLİK) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Behiç SERPEK

KONYA-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOÇLARDA ÇİNKO TAKVİYELERİNİN PLAZMA
KİSSPEPTİN VE MELATONİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Halil HARMAN

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA (VETERİNERLİK) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Behiç SERPEK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202030 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2019

ÖNSÖZ

İz elementlerden çinko; sperm kalitesini arttırması, iştah düzenlemesi, antioksidan sistemler, bağışıklık sistemi, DNA eşleşmesi gibi birçok biyokimyasal reaksiyonda görev alması bakımından hayati öneme sahiptir. LH, TSH, testosteron, leptin gibi hormonların regülasyonunda rol oynadığı konusunda elde edilen bilgiler çinkonun koyunlarda seksüel siklusların harekete geçirilmesi, koçlarda sperm kalitesinin artırılması ve libidonun iyileştirilmesinde önemli görevler alan ve birbirleriyle bağlantılı olarak çalışan kisspeptin ve melatonin hormonlarında üretim ve salınımlarını etkileyebileceği düşüncesini doğurmuş, bu noktadan hareketle normal rasyonlarına 100 mg/kg/KM ZnO ilave edilen Kıvırcık Melezi koçlardan bir yıl boyunca her ay alınan kan örneklerinde plazma melatonin ve kisspeptin düzeyleri ölçülerek çinkonun bu düzeylere etkileri araştırılmıştır.

Araştırmanın yürütülmesinde ve örnek alımlarında yardımcı olan Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Melih AKSOY ve Araştırma Görevlisi Uğur UÇAN'a, plazma örneklerinin analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Doktor Öğretim Üyesi Erdal DAŞGIN, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma Görevlisi Beyza SUVARIKLI ALAN ve Uzman Avni İLİK'e katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çinko.....	1
1.1.1. Çinkonun Emilimi ve Metabolizması.....	1
1.1.2. Çinkonun Fonksiyonları.....	3
1.2. Leptin.....	4
1.2.1. Leptin Salınımı ve Etki Mekanizması.....	5
1.2.2. Leptin Yetersizliğinde Şekillenen Bozukluklar.....	8
1.2.3. Leptin ve Üreme.....	9
1.2.4. Leptin ve Çinko.....	10
1.3. Kisspeptin.....	11
1.3.1. GPR54 ve Kisspeptin.....	12
1.3.2. Kisspeptinin GnRH/LH/FSH Sekresyonu Üzerine Etkisi.....	14
1.3.3. Kisspeptinin Mevsimsel Üremedeki Rolü.....	17
1.3.4. Kisspeptin ve Üremenin Metabolik Kontrolü.....	17
1.3.5. Kisspeptin ve Fotoperiyot.....	18
1.3.6. Kisspeptin ve Leptin.....	19
1.3.7. KNDy Hipotezi.....	20
1.3.8. Kisspeptin ve Anöstrus.....	21
1.4. Melatonin.....	22
1.4.1. Melatoninin Tarihçesi.....	22
1.4.2. Melatoninin Sentez ve Metabolizması.....	23
1.4.3. Melatonin Reseptörleri.....	25
1.4.4. Melatonin ve GnRH/LH Aksisi.....	26
1.4.5. Melatoninin Nörosteroidlerle Etkileşimi.....	27
1.4.6. Melatonin ve Reprodüksiyon.....	28

1.4.7. Melatonin, Çinko ve TSH.....	28
1.4.8. Melatonin Kemik ve Lipid Metabolizması ile İlişkisi.....	30
1.4.9. Melatonin Antioksidan Etkisi.....	31
1.4.10. Melatonin ve İmmun Sistem.....	32
1.4.11. Melatoninin Termoregülasyon ve Biyolojik Saatteki Rolü.....	33
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
2.1. Deneklerin Seçimi ve Beslenmesi.....	34
2.2. Kan Örneklerinin Toplanması.....	34
2.3. Hormon Analizleri.....	34
2.3.1. Melatonin Elisa Kiti	35
2.3.2. Kisspeptin Elisa Kiti	36
2.3.3. İstatistiksel Analiz.....	37
3. BULGULAR.....	38
3.1. Kisspeptin.....	38
3.2. Melatonin.....	43
4. TARTIŞMA.....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
6. KAYNAKLAR.....	54
7. EKLER.....	67
Ek-A: Etik Kurul Kararı.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR.

µg: Mikrogram.

CA: Canlı Ağırlık.

CRH: Kortikotropin Relaising Hormon.

dl: Desilitre

DM: Dry matter.

DNA: Dezoksiribonükleik asit.

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit.

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Erα: Östradiol Reseptörü-α.

fmol: femtomol

FSH: Folikül stimüle edici hormon.

GABA: γ- aminobütirik asit

GnRH: Gonadotropin relaising hormon.

HDL: High dansity lipoprotein.

IU: İnternasyonal ünite.

İ.v. :İntravenöz

kDa: Kilodalton

Kiss1-R: Kisspeptin1- reseptörü.

KM: Kuru madde.

LDL: Low dansity lipoprotein.

LH: Luteinize edici hormon.

µl: mikrolitre

mmol: milimol

mRNA: Haberci RNA.

MSH: Melanosit stimüle edici hormon.

n: Örnek sayısı

NEFA: Non esterified fatty acid.

ng: nanogram

p: İstatistiki değer

pg: pikogram

pmol: pikomol

ppm: Milyonda bir.

RNA: Ribonükleik asit.

$S_{\bar{x}}$: Ortalama değer in standart hatası

STAT: Sinyal iletici ve transkripsyon aktivatörü.

TSH: Tiroid stimüle edici hormon.

\bar{x} : Ortalama değer

X_{\min} : En düşük değer

X_{\max} : En yüksek değer

ZnMet: Çinko metionin

ZnO: Çinko oksit

ZnSO₄: Çinko sülfat

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Koçlarda Çinko Takviyelerinin Plazma Kisspeptin ve Melatonin Düzeyleri
Üzerine Etkisi**

Halil HARMAN

Biyokimya (Veterinerlik) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2019

Koçların rasyonlarına eklenen çinkonun kisspeptin ve melatonin düzeylerine olan etkisinin araştırıldığı çalışma 2 yaşında 6'sı kontrol, 6'sı deneme grubu olmak üzere 12baş Kıvırcık Melezi koçta 1 yıl sürdürülmüştür. Ad libitum kuru yonca samanı yanı sıra kontrol grubuna 25 mg/kg/KMZnO, deneme grubuna 125 mg/kg/KM ZnO içeren karma yemden (arpa, tuz ve standart olarak vitamin-mineral karması) hayvan başına günlük 150 g verilmiştir. Deneme süresince her ay koçlardan alınan kan örneklerinden kazanılan plazmalarda Elisa yöntemiyle kisspeptin ve melatonin düzeyleri ölçülmüştür.

Melatonin düzeyleri kontrol ve deneme gruplarında mevsimsel değişimler göstermiş, kontrol grubunda nisan ayında 22.1 ± 14.1 ng/L bulunan düzeyler, haziran ayında yükselmeye başlamış (93.8 ± 45.5 ng/L) ve eylül ayından sonra tekrar gerilemiştir. Deneme grubunda benzer bir seyir gözlenmiş, nisan ayında 62.8 ± 26.2 ng/L olan düzeyler haziran ayında 164.5 ± 61.7 ng/L'ye ulaşan ve ekim ayına kadar yüksek olan düzeyler kasım ayında hızlı bir düşüşle 46.6 ± 26.5 ng/L'ye kadar gerilemiştir. Çinko ilaveleri deneme grubunun düzeylerini belirgin olarak artırmasına karşın, bireysel değerlerin çok değişkenlik göstermesi nedeniyle farklılıklar istatistik açıdan anlamlı bulunmamıştır.

Kisspeptin düzeylerinde de melatonin düzeylerine benzer şekilde mevsimsel değişimler gözlenmiş kontrol grubunda nisan ayında gözlenen düzeyler (92.6 ± 54.0 ng/L) mayıs ayında yükselmeye başlamış ve haziran ayında en yüksek düzeylere ulaştıktan sonra (356.6 ± 184.6 ng/L) ekim ayına kadar (216.4 ± 193.7 ng/L) yüksek seyretmiş ve kasım ayında başlayarak hafif bir gerileme görülmüştür. Deneme grubunda nisan ayında gözlenen 209.8 ± 94.4 ng/L'lik düzeyler kontrol grubuna benzer bir şekilde haziran ayında en yüksek değere ulaşmış (514.2 ± 180.4 ng/L), ekim ayına kadar hafif salınımlarla korunan düzeyler kasım ayında hızlı bir düşüşle 215.5 ± 124.8 ng/L'ye kadar gerilemiştir. Deneme kontrol grupları arasında özellikle yaz aylarında ve üreme dönemlerinde önemli farklar gözlenmesine karşın, bireysel değerlerin büyük salınımlar göstermesi nedeniyle farklılıklar istatistik açıdan önemli bulunamamıştır. Sonuç olarak koçlarda melatonin ve kisspeptin

düzeylelerinin mevsimsel değişimler gösterdiği ve özellikle üreme dönemlerinde kisspeptinde daha belirgin olmak üzere önemli derecede arttığı, ZnO'in hem melatonin hem de kisspeptin düzeylerini yine üreme dönemlerinde önemli derecede etkiyebileceği, ancak bireysel değerlerin büyük değişimler göstermesi nedeniyle kesin bir kaniya ulaşmak için daha fazla sayıda hayvan içeren gruplarda çalışılmasının zorunlu olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Kisspeptin, Çinko, Koç



SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effects of Zinc Supplementation on Plasma Kisspeptin and Melatonin Levels in Rams

Halil HARMAN

Department of Biochemistry (Veterinary Medicine)

pHD THESIS / KONYA-2019

The study that researched the effect of zinc added to the rations of rams on kisspeptin and melatonin levels was continued on 12 Kivircik crossbreed rams (6 control, 6 experimental) for 1 year. In addition to the ad libitum dry trefoil straw, was given mixed feed (barley, salt and vitamin-mineral mixture as standard) supplemented with 25 mg/kg/ DM ZnO, for the control group and the 125 mg/kg/ DM ZnO for experimental group per day. During the study, blood samples were taken once a month and kisspeptin and melatonin levels were measured in plasmas obtained from blood samples with Elisa.

Melatonin levels showed seasonal changes in both control and experimental groups. The levels of the control group were found 22.1 ± 14.1 ng/L in April, started to alter (93.8 ± 45.5 ng/L) in June and decreased after September. A similar progress was observed in the experimental group, the levels of melatonin were found 62.8 ± 26.2 ng/L in April, 164.5 ± 61.7 ng/L in June, and the highest levels until October decreased dramatically to 46.6 ± 26.5 ng/L in November. Although zinc supplementation significantly altered the levels of the experimental group, the differences were not statistically significant, due to individual values were highly variable.

Kisspeptin levels, similar to the levels of melatonin, seasonal changes were observed in the control group. The levels observed in April started to alter in May and after reaching the highest levels in June (356.6 ± 184.6 ng/L) remained high until October (216.4 ± 193.7 ng/L) and a slight decrease was observed starting from November. In the experimental group, the levels of 209.8 ± 94.4 ng/L observed in April reached the highest level in June, similar to the control group (514.2 ± 180.4 ng/L). The levels maintained with slight releases until October and decreased rapidly to 215.5 ± 124.8 ng/L in November. Although significant differences were observed between experimental and control groups especially during the summer months and reproductive periods, differences were not found to be statistically significant because of the large variations of individual values. As a result, it can be said that melatonin and kisspeptin levels in rams showed seasonal changes and increased significantly during the reproductive periods, in kisspeptin levels more specifically, ZnO can be significantly affective both melatonin and kisspeptin levels in reproductive periods, however,

because of the individual values that shows large variations, it is essentially to work in groups with large numbers of animals in order to reach a definite conclusion.

Keywords: Melatonin, Kisspeptin, Zinc, Ram



1. GİRİŞ

1.1. Çinko

Çinkonun vitamin sentezi, hormon üretimi, enzim aktivasyonu, enerji üretimi, üreme, büyüme ve gelişme gibi hayati fonksiyonlara aracılık eden iz elementlerin psikolojik işleyişler için hayati önem taşımakta olduğu ve eksikliklerinde büyüme ve gelişmede gerileme, üreme bozuklukları, verim kaybı, bağışıklık sisteminin zayıflaması ve histolojik olarak organlarda yapısal bozukluklara yol açtığı bildirilmektedir (Haenlein ve Anke 2011).

1.1.1. Çinkonun Emilimi ve Metabolizması

Çinko emiliminin büyük bir kısmı ince bağırsaklarda gerçekleşirken küçük oranlarda midede gerçekleştiği, ruminantlarda rumen ve retikulumdaki çinko emiliminin obamasuma göre daha yüksek olduğu, çinko emilim mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte fareler üzerinde yapılan bir çalışmayla çinko emiliminin periselüler taşıyıcı sistemlerle gerçekleştiği ve mikrovilluslar tarafından sınırlandırıldığı bildirilmiştir (Rucker ve ark 1994).

Plazmadaki çinko'nun %30 oranında globuline bağlanırken %70 oranında albumine bağlandığı, karaciğerde ve kemikte bulunan çinko depolarının sadece diyetle alınan çinko ile arttırılabildiği, gelişim dönemindeki canlılarda kemik çinko düzeylerinin çinkodan yararlanmanın parametresi olarak kullanılabileceği, saç çinko düzeylerininse çinko yetmezliklerinin tanısında kullanılabileceği, karaciğerde metalotionin yapısında depolanan çinkonun temel atılım yolunun dışı olduğu bildirilmiştir (Rucker ve ark 1994, Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Organik kaynaklardan elde edilen çinkonun biyo-yararlanımının inorganik çinkoya göre daha yüksek olduğu ortaya konmuş, iyonize çinko ve aminoasit solüsyonundan şelasyonla elde edilmiş ya da kısmen hidrolize edilmiş protein ve inorganik çinko kaynaklarından oluşmuş organik ZnMet'in (çinko metionin) boğalarda bir yandan plazma, karaciğer, böbrek çinko seviyelerini yükseltirken, bir yandan da karkas ağırlığını önemli derecede artırdığı, tırnak kalitesini iyileştirdiği, bildirilmiştir (Spears 1996, Spears ve Keagley 2002, Kessler ve ark 2003, Wrightand ve Spears 2004).

Hassan ve ark (2011) inorganik ($ZnSO_4$) ve organik (ZnMet) kökenli Zn'nun bazı verim özelliklerine etkilerini Mısır'ın Barki ırkı koyunlarında incelemişler, süt üretimi ve antioksidan kapasitedeki artışın organik Zn kullanılan gruplarda daha yüksek olduğunu, ancak kan ya da rumen parametrelerinde bir farklılık görülmediğini bulmuşlardır.

Çinko toksikasyonu ile ilgili vakalar ile sık karşılaşılmamakla birlikte düvelerin ve tosunların günlük 500 mg çinko ilavesine toleranslı olduğu, 900 mg çinko ilavesinde verim düşüklüğü gözleendiği, sütçü ineklerin 1300 mg çinkoya tolerasyonlu olduğu fakat süt veriminde düşmeler gözleendiği, zayıf ve anemik buzağılarda çinko toksikasyonuna bağlı ölümlerle karşılaşıldığı, küçük ruminantlarda çinko toksikasyonunun (Günlük rasyona 1200 mg/kg) gelişim dönemindeki kuzularda kilo kaybına, deri altı ödeme, proteinüriye ve asitese yol açarken, gebe koyunlarda (Günlük rasyona 750 mg/kg) abortlara yol açtığı saptanmıştır (Ott ve ark 1966a, 1966b, 1966c, Davies ve ark 1977, Allen ve ark 1983).

Çizelge 1.1. Bazı ruminantların çinko gereksinimleri. (ARC: Agricultural Research Council 1980, NRC: National Research Council 1985, National Research Council 2001)

TÜR	GEREKSİNİM		KAYNAK
	mg/gün	mg/kg KM	
Buzağı			
40 Kg CA	28	28	ARC (1980)
80 Kg CA	69	34	ARC (1980)
Düve 500 Kg CA	310	31	NRC (2001)
İnek 650 Kg CA	1261	63	NRC(2001)
Öküz 100-300 Kg CA	95-188	17-35	ARC (1980)
Kuzu 10 Kg CA	9,7	24	ARC (1980)
Kuzu 20 Kg CA	20	32-36	ARC (1980)
Kuzu 40 Kg CA	29	29-49	ARC (1980)
Koyun Gelişim Dönemi		20	NRC (1985)
Koyun Üreme Dönemi		33	NRC (1985)
Koyun Gebelik Dönemi	34	20-24	ARC (1980)
Koyun Laktasyon Dönemi	46-94	24-39	ARC (1980)

1.1.2. Çinkonun Fonksiyonları

Yaklaşık 300 enzimin integral bir komponenti olan Zn karbonik anhidraz, alkalın fosfataz, RNA ve DNA polimeraz, timidin kinaz, karboksipeptidaz, alkol dehidrogenaz, süperoksit dismutaz gibi önemli metalloenzimlerin yapısında prostetik grup olarak yer aldığı, karbonhidrat, lipid, nükleik sentezi ile nükleik asit metabolizmasında önemli rol oynadığı, deniz ürünleri, hıubut, baklagil ve sert kabuklu yemişlerde bol miktarda bulunan çinkonun tat ve koku reseptörlerinin düzenli olarak çalışmasını sağladığı, çinko-insülin metal kompleksi halinde insülinin vücutta depolandığı bilinmektedir (Kalaycıoğlu ve ark 2006).

Çinkonun yapılarına katıldığı enzimler aracılığıyla metabolik olaylarda, büyüme ve gelişmede yaygın olarak görev aldığı, annede gelişen Zn eksikliklerinde

de fôtus gelişimi bozuklukları ve zayıf yavru doğumlarının şekillendiği bildirilmiştir (Prasad ve Kundu 1995, Ian Darnton 2013).

Kundu ve ark (2014) Teresa ırkı keęilerde 50 ve 100 ppm dűzeyinde rasyona eklenen ZnO'nun reprodűktif performansa etkilerini arařtırmıřlar ve ۆstrusun oluřumunu, gebelik oranı, yavru sayısı ۆstrus dۆngűsűnű anlamlı řekilde dűzelittięini saptamıřlardır. Bazal olarak 12.3 ppm çinko bulunan rasyonlara, 0, 50, ve 100 ppm ZnO eklemiřler birinci grup rasyonuna 0ppm, ikinci grup rasyonuna 50 ppm, ۆçűncű grup rasyonuna 100 ppm gűnlűk tűketecek řekilde çinko oksit ilave etmiřler ve tedavi gruplarında kontrol grubuna gۆre ۆstrus bařlangıcı ve gebelik oranlarında kayda deęer artıřlar gۆzlemiřlerdir (izelge 1.2).

Çizelge 1.2. Çinko takviyelerinin teressa ırkı keęilerde reprodűktif performansa etkisi. $p<0.05$ (Kundu ve ark 2014)

Reprodűktif Parametreler	Kontrol (n=6)	50 ppm ZnO (n=6)	100 ppm ZnO (n=6)
Östrus, %	66,66 (4) ^b	83,30(5) ^{ab}	100(6) ^a
Gebelik Oranı, %	50,00 (3) ^b	66,66 (4) ^{ab}	100 (6) ^a
Yavru Oranı, %	87,50 (3) ^b	90,90(4) ^{ab}	91,70(5) ^a
Östrus Dۆngűsű, gűn	25,30±0.42 ^a	20,40±0.37 ^{ab}	17,70±0.34 ^b

Kozat ve ark (2007) bűyűme gerilięi gۆrűlen (n=50) ve saęlıklı 1 yařındaki koçların (n=20) serum Zn, Cu ve Co dűzeyleriyle, glikoz T₃, T₄ ve TSH konsantrasyonlarını belirlemiřler, kan glikoz ($p<0.001$) ve T₃ ($p<0.01$) dűzeyleriyle, incelenen iz elementlerden Zn ($p<0.001$), Cu ($p<0.01$) ve Co ($p<0.01$) konsantrasyonlarının bűyűme gerilięi gۆrűlen koçlarda anlamlı derece dűřűk olduęunu, T₄ ve TSH dűzeylerinde ise ۆnemli bir farklılık bulunmadıęını gۆzlemiřler, normal bűyűme için Zn bařta olmak ۆzere iz elementlerin yeterli miktarlarda alınmasının zorunlu olduęunu vurgulamıřlardır.

1.2. Leptin

Leptin 16 kDa aęırlıęında 167 aminoasitten oluřan, 7. kromozomun uzun kolunda yer alan Ob geninden kodlanan protein yapıda bir hormondur. Vűcutta bařlıca adipoz dokudan sentezlenen leptinin dűřűk oranlarda plasenta, mide mukozası, iskelet kası, hipofiz ve meme bezi tarafından da salgılandıęı

bildirilmektedir (Zhang ve ark 1994, Pelleymounter ve ark 1995, Mercer ve ark 1996). Kanda serbest ve proteine bağılı iki ayrı formda bulunan leptinin serbest formunun aktiviteden sorumlu olduğu saptanmıştır (Campfield ve ark 1995, Friedman ve Halaas1998).

Leptinin dolaşımdaki yarılanma ömrünün yaklaşık 30 dakika olduğu ve pulsatif olarak öğünlerden 2-3 saat sonra salgılandığı, sabah saatlerinde pik yapan hormon düzeylerinin öğle saatlerinden sonra tekrar bazal düzeylere gerilediğı, serum düzeylerinin kadınlarda erkelere göre yüksek seyretmesinin kadınlarda yağ dokusunun fazlalığından köken alabileceğı öne sürülmektedir (Boden ve ark 1996, Ostlund ve ark 1996).

Leptinin keşfinden önce obezitenin nedenleri arasında; vücut ısısına bağılı olarak enerji harcanmasından vücut ağırlığının etkilenmesi, enerji depolarının plazma glikozu tarafından regüle edildiğı glikostatik teori ve kanda bulunan yağ metabolizması ürünlerinin spesifik reseptörlerle bağlanarak yağ dokunun oluşumunu artırmasından kaynaklandığını ileri süren lipostatik teorisinin bulunduğu bildirilmektedir (Castracane ve Henson 2007). 1994 yılında Friedman ve araştırma ekibi tarafından Rockefeller Üniversitesinde bulunan Friedman laboratuvarında Ob geni üzerinden kodlanan leptin hormonu ve Ob geni tarafından kodlanan leptin reseptörünün keşfedilmesi ve 1996 yılında rekombinant fare leptini uygulanan mutant farelerin canlı ağırlıklarının %40 oranında kaybolması vücut ağırlığının kontrolünde leptinin etkili olduğunu göstermiştir (Castracane ve Henson 2007).

1.2.1. Leptin Salınımı ve Etki Mekanizması

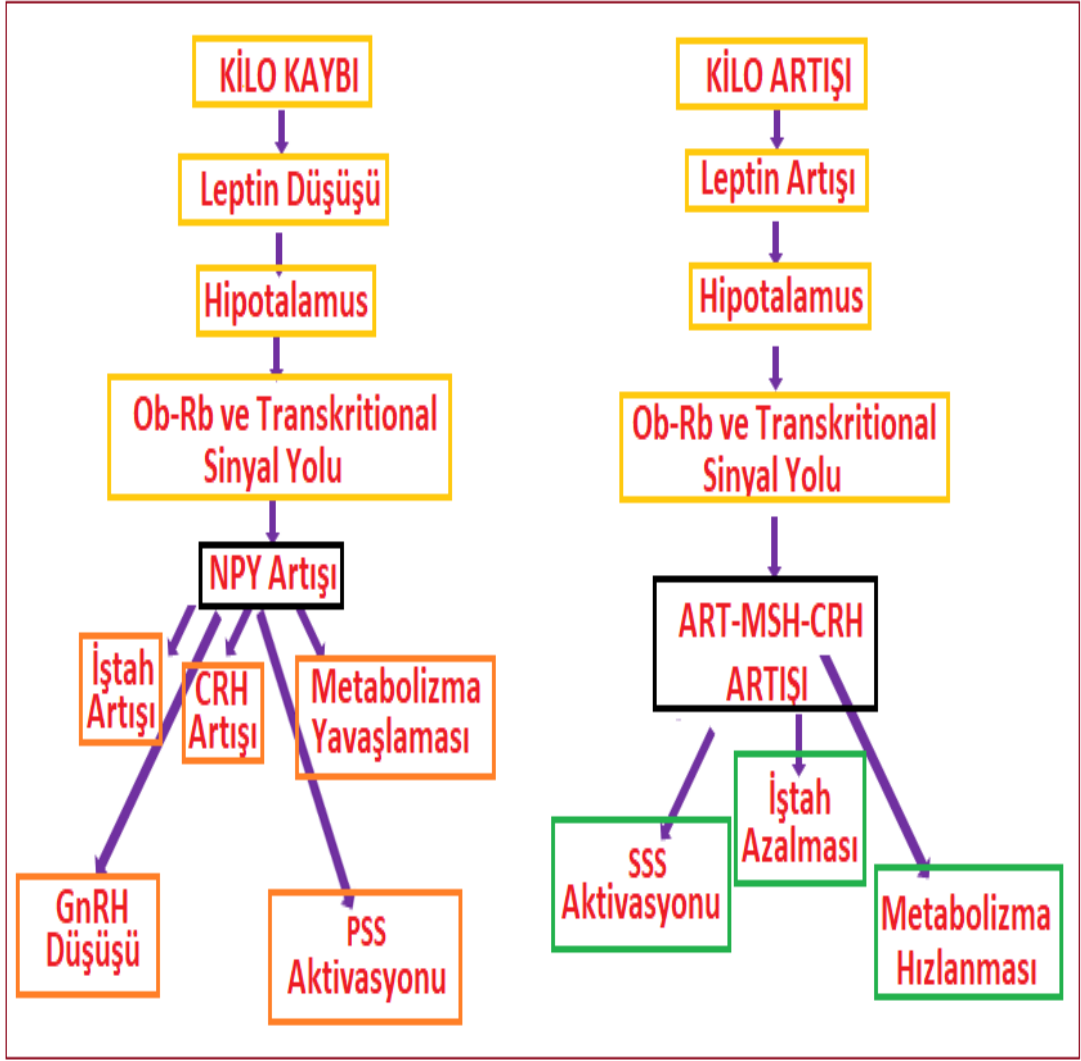
Adipoz hücrelerde sentezlenen leptinin bir kısmı plazmada bazal düzeylerde dolaşırken, bir kısmının da adipoz hücrelerin endoplazmik retikulumunda depolandığı, bu depolanan leptin hormonunun salınımında insülin ve deksametazonun etkisi olduğu ve her ikisinde plazma leptin seviyesini iki katına çıkarabildiğı bildirilmiştir (Bradley ve Cheatham 1999).

Adipositlerden herhangi bir nedenle leptin salınımıyla birlikte hormonun çeşitli hipotalamik çekirdek bölgelerinde reseptörüyle bağlanmak üzere bir sinyal yolu oluşturduğu tespit edilmiştir (Mercer ve ark 1996, Spanswick ve ark 1997, Friedman ve Halaas 1998). Satoh ve ark (1997) hipotalamik lezyonları olan ob

(leptin defektli) fareler ile db (leptin reseptörü defektli) farelerin canlı ağırlık artışlarının aynı olduğunu gözlemlemişler ve leptinin hipotalamusla olan ilişkisini ortaya koymuşlardır. Halaas ve ark (1997) intraserebral leptin enjeksiyonu yapılan farelerde gıda tüketiminde düşme ve canlı ağırlık kaybı gözlenirken, periferal leptin enjeksiyonu uygulanan farelerde herhangi bir etkinin görülmemesinin leptin-hipotalamus arasındaki bağlantının kanıtı olduğunu öne sürmüşlerdir.

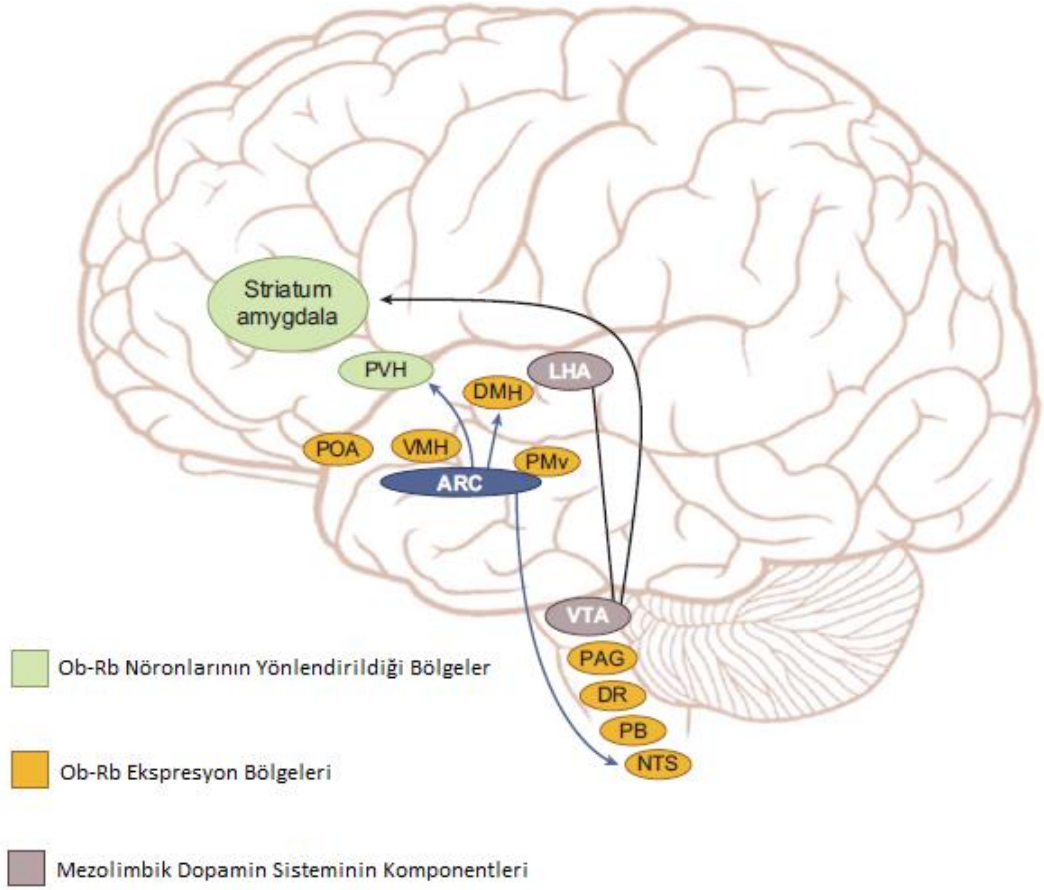
Friedman ve Halaas (1998) leptinin hipotalamik çekirdek bölgesinde yer alan Ob-R geninden kodlanan Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd ve Ob-Re olmak üzere 5 farklı reseptörünün olduğunu ve bu reseptörlerin intraselüler ve ekstraselüler bölge olarak adlandırılan iki adet birleşme alanının bulunduğunu saptamışlar, söz konusu reseptörlerden ilk önce Ob- Ra ve Ob-Rb nin fonksiyonları ortaya konulmuş, Ob-Ra reseptörünün leptinin kan beyin bariyerini geçişine aracılık ederken, Ob-Rb reseptörününsevücut ağırlığı regülasyonunda hipotalamus ile leptin arasında sinyal yolu oluşturduğu bildirilmiştir (Mercer ve ark 1996, Spanswick ve ark 1997, Friedman ve Halaas 1998).

Leptinin vucut ağırlığının kontrolündeki bu görevini Ob-Rb üzerinden nöropeptidler, melanosit stimüle edici hormon (MSH) ve kortikotropin relaising hormon(CRH) salınımını artırmasıyla bir yandan gıda alınımını azalması, bir yandan da enerji tüketiminin artırılması üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiş, leptin yetersizliklerinde nucleus arcuatustan artırılarak vücut ağırlığının regülasyonunda görev aldığı öne sürülmüş, alternatif olarak leptin yetersizliğinde nöropeptid Y nin arkuat çekirdekten salınımının artmasıyla birlikte enerji tüketiminin düşmesi, gıda alınımının artması, büyüme hormonu ve GnRH düzeylerinde belirgin düşüşler gözlemlendiği, leptinin noksanlığında parasempatik sinir sisteminin fonksiyonlarının arttığı saptanmıştır (Şekil 1.1) (Friedman ve Halaas 1998).



Şekil 1.1. Leptin Hormonunun Etki Mekanizması (Friedman ve Halaas 1998).

(NPY: Nöropeptid Y. PSS: Parasempatik Sinir Sistemi. SSS: Sempatik Sinir Sistemi. ART: Agouti - Related Transcript. MSH: Melanosit Stimulan Hormon. CRH: Kortikotropin Relaising Hormon Ob-Rb: Leptin Reseptörü).



Şekil 1.2. Leptinin beyindeki salınım ve etkileşim alanları (Martin G ve ark 2008)

(PVH: Paraventriküler Hipotalamik Çekirdek, VMH: Ventromedial Hipotalamik Çekirdek, DMH: Dorsomedial Hipotalamik Çekirdek, LHA: Lateral Hipotalamik Alan, PMv: Ventral Premamillar Çekirdek, POA: Preoptik Alan, VTA: Ventral Tegmental Alan, PAG: Periaquadukt Gri, DR: Dorsal Rafe, PB: Parabrahial Çekirdek, NTS: Solitary Tract Çekirdeği ARC: Arkuat Çekirdek)

1.2.2. Leptin Yetersizliğinde Şekillenen Bozukluklar

Bray (1991) leptin defektli Ob farelerde leptin yetersizliğinden dolayı nöroendokrin sistemin aksadığını, infertilite veya subfertilite tablolarının gözlemlendiğini, tiroid bezi bozukluklarıyla birlikte kortikosteron seviyelerinin normal farelere göre belirgin düzeyde yüksek olduğunu, söz konusu bu nöroendokronik bozuklukların yanında Ob farelerin normal farelere göre daha hipotermik ve diyabetik olduğunu, hemolitik fonksiyonların ve immun sistemin de düzensiz çalıştığını bildirmiştir.

Leptin bozukluklarına bağı tablolarda leptin ile tedavi edilen hastalarda önemli ölçüde iyileşme belirtilerinin gözlenmesi, leptinin klinikte tedavi edici etkisini ortaya koymuştur. Kemik yaşı olarak pubertaya ulaşmış ancak puberta belirtileri göstermeyen genç kadınlara uygulanan leptin ilaveleri ile pubertaya ve mensturasyona giriş başarılıdır (Farooqi ve ark 1999). Leptin yetersizliklerinde TH1 ve TH2 sitokinlerine bağı bozukluklarla ilgili olarak bağışıklık sisteminde zayıflıkla birlikte şekillenen enfeksiyöz hastalıkların artışı gözlenmiş, leptinle tedavi edilen bu hastalarda immun bozukluklarda düzelmeye şekillendiğı, leptinin immun sistem üzerindeki bu güçlendirici etkisi ile ileri derecede yapısal zayıflıklar, kanser ve kronik immun hastalıkların tedavisini olumlu yönde etkilemiştir (Ahima ve ark 1996, Lord 1998, Ozata ve ark 1999).

Wang ve ark (2010) insülin yetersizliğı olan farelerde leptin takviyeleri ile kan glikoz seviyelerinin düşürüldüğünü, bu etkinin de leptinin glukagonu inhibe etmesi üzerinden gerçekleştirildiğini, leptinin insülin yetmezliklerine bağı olarak gelişen diyabetin tedavisinde kullanılabileceğini öne sürerlerken, Abecia ve ark (2015) da koyunlarda yetersiz beslenme sonucu süperovulasyon oranları ve embriyo kalitesinin belirgin bir şekilde düştüğünü, buna karşın leptin ve esterleşmemiş yağ asitleri düzeylerinin artmasının, enerji ihtiyacı hallerinde leptinin lipolitik aktiviteyi yükselterek yağların kullanımını regüle edebildiğinin işareti olduğunu öne sürmüşlerdir.

1.2.3. Leptin ve Üreme

Yetişkin koçlarda preoptik-hipotalamik yolun etkin bir şekilde çalışması ve reproduktif faaliyetlerin sürekliliğı için gerekli olan faktörlerden önemlisinin sağlıklı beslenme olduğu bildirilmiş (Blache ve ark 2002, 2003), Zhang ve ark (2004) da enerji ve protein alımından bir kaç saat sonra GnRH salınımına bağı olarak LH pulzasyon sıklığının 2 katına çıktığını saptamışlardır. Enerji ve protein yönünden 5-7 gün boyunca zengin beslenme ile bu LH etkisi 3-4 hafta stabil kalabilirken, 4. haftadan sonra vücut ağırlığının ve yağ dokusunun artmasıyla birlikte gelişen gonadotropik yoldaki aksamalar ve aktivasyon düşüklüklerinin seksüel aktiviteler de düşmeye yol açtığı, bu olgunun beslenme sinyalleri ile preoptik-hipotalamik bölgenin bağlantısını gösterdiği öne sürülmüştür (Woods ve ark 2000).

Ruminantlarda insülin ve leptin'in metabolizmaya ve reproduksiyona etkisi olduğu düşünülmüş (Barb ve Kraeling 2004), ancak merkezi sinir sistemine leptin veya insülin verilmesinin yem tüketimini düşürmesine karşın, GnRH-LH salınımına her hangi bir etkisi olmadığı belirlenmiş (Henry ve ark 1999, Morrison ve ark 2001, Blache ve ark 2002), ovarektomi uygulanmış koyunlarda yem kısıtlaması halinde merkezi sinir sistemine leptin verilmesinin LH pulslarını artırmadığı (Nagatani ve ark 2000), koçlarda intraserebral leptin uygulamalarının LH pulzasyon sıklığını arttırdığı bildirilmiştir (Henry ve ark 2001, Miller ve ark 2002).

1.2.4. Leptin ve Çinko

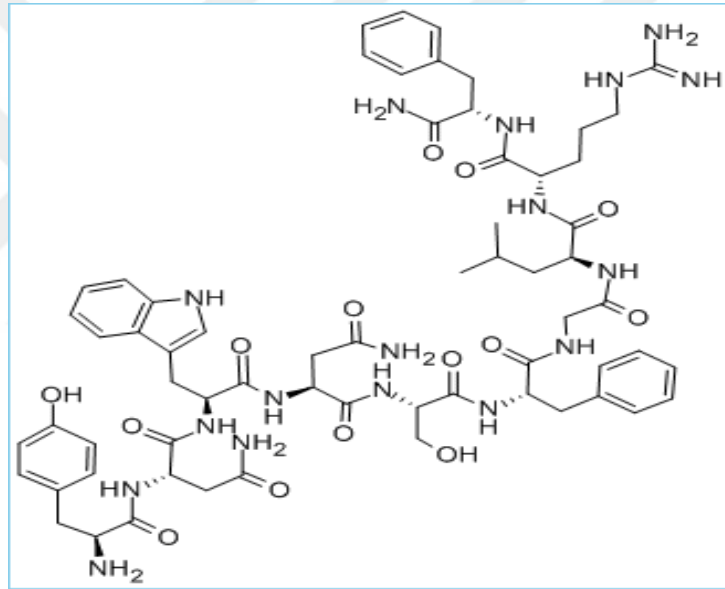
Leptin'in vücut ağırlığının regülasyonu ve enerji balansının ayarlanmasına katıldığı(Zhang ve ark 1994, Rink 1995), beyin ve vücudun enerji depoları arasında bir iletişimi sağladığı ve bu etkisini hipotalamik çekirdekler bölgesinden oreksigenik nörotransmitterlerin salınımını düşürerek, bir yanda iştahın kapatılması, bir yandan da enerji tüketiminin artırılmasıyla sağlandığı bildirilmektedir (Pelleymounter ve ark 1995, Mantzoros ve ark 1996, Ahima ve ark 1996).

Çinko ile yürütülen ilk çalışmalarda Zn'nun iştahın regülasyonunda rol oynadığı, insanlarda ve rodentlerde çinko yetersizliğinin iştah kapanmasına yol açtığı, takviyelerinin ise iştahı arttırdığı bildirilmiştir (Prasad 1991, McClain ve ark 1993, Prasad 1996). Zayıf ve çinko yetersizliği bulunan bireylere uygulanan çinko takviyeleri ile yağsız vücut kütlelerinde artış kaydedilirken, yağlı vücut kütlelerinin stabil kaldığı yada azaldığı (Prasad 1991, Ninh ve ark 1996), çinkonun iştah ve vücut kütlesi üzerine olan bu etkisini hipotalamusa bağlı nucleus arcuatus bölgesinde etkili leptin ile birlikte gösterdiği sanılmaktadır (Mangian ve ark 1997).

Chen ve ark (2000) obezite konusunda yapılan çalışmalarda plazma Zn düzeylerindeki düşmeleri leptin düzeylerinin azalmasının izlediğini, invitro ortamda kadınların adipoz doku hücre kültürlerine 0.2 mmol/L çinko ilavesiyle leptin düzeylerinde % 142 oranında bir artış sağlanmasının Zn ve leptin düzeyleri arasındaki pozitif korelasyonun varlığını kanıtladığını bildirmişlerdir.

1.3. Kisspeptin

Kiss1 geni ilk olarak 1996 yılında kanser yayılmasını engelleyen bir gen araştırmasında bilim adamları tarafından keşfedilmiştir(Lee ve ark 1999). Bu çığır açan buluş daha sonraları Pensilvanya’da birçok bilimsel araştırmada ele alınmış ve Hersey bölgesindeki bir çikolata fabrikasının meşhur ürünü olan Hersey’s Kisses adlı çikolatadan esinlenerek genin ismi Kiss1 olarak tanımlanmış, yapılan araştırmalarda KISS-SS harflerine supressor sequence (baskılayıcı sekans) açılımı verilerek bilimsel bir anlam kazandırılmıştır. Daha sonralarda Kiss1 geni tarafından kontrol edilen bir grup proteinin varlığı saptanmış, aktif bölgeleri aynı, aminoasit sekansları farklılık gösteren (Kisspeptin- 54, 14, 13 ve 10) bu yapılara da kisspeptin adı verilmiştir (Lee ve ark 1996).



Şekil1.3. Kisspeptin 10’un karbon iskeleti

(http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8390631.htm)

Puberta oluşumu halen tam olarak çözülememiş gizemli olgulardan birisi olarak karşımızda durmaktadır. Uzun zamandır ergenliğin beyinden salınan bir dizi hormonun etkisiyle erkeklerde testislerin, dişilerde ise ovaryumların gelişmesiyle şekillendiği bilinmektedir. Yakın zamanda keşfedilen kisspeptin hormonunu yetersizliklerinde ergenliğin oluşumunda sorunların ortaya çıkması kisspeptin’in ergenliğin oluşumunda önemli olabileceği düşüncesini doğurmuş, memelilerde kisspeptin enjeksiyonlarının GnRH salınımını önemli derecede artırması, genç ratlarda tekrarlanan kisspeptin enjeksiyonlarının pupertayı hızlandırmasıyla bu

düşünce doğrulanmış ve kisspeptin'in kesin olarak pubertanın oluşumuna katıldığı kanıtlanmıştır (Dhillon 2008). Dişi ratların beyinlerinde bulunan ve kisspeptini bağlayarak etkisiz hale getiren bir antikoron ratlarda üreme fonksiyonlarının olumsuz etkilemesi, hatta bloke etmesi, keza aç bırakılan ratlarda kisspeptin uygulaması sonucunda GnRH salınımının sürdürülebildiğini saptamışlardır ve uzun süre açlık hallerinde memeli hayvanların günlük fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla vücutlarında depo ettikleri enerjiyi idareli kullanabilmek için üreme sistemlerini uyku formatına aldıklarını, ancak doğal yoldan gelişen bu tepkinin kisspeptin uygulamaları sonucunda üreme fonksiyonlarının tekrar başlatıldığını bildirmişlerdir (Smith ve ark 2006a, Zhou Q ve ark 2014).

1.3.1. GPR54 ve Kisspeptin

GPR54 reseptörü, memeli beyinde yaygın olarak bulunan galanin reseptörleri ile % 45 oranında benzerlik taşımakta ve G proteini bağlantılı reseptörler (GPCR) ailesinin bir üyesi olarak bilinmektedir. 1996 yılında keşfedilen GPR54 pek çok merkezi sinir sistemi alanları yanında periferik olarak da tespit edilmiştir (Lee ve ark 1999). İnsanlarda, GPR54 reseptörünün özellikle plasenta, hipofiz, pankreas ve medulla spinaliste yüksek oranlarda ekspresyonu, bu reseptörün endokrin fonksiyonlara sahip olabileceği düşüncesini ortaya koymuştur (Kotani ve ark 2001). Günümüzde kanser yayılmasını baskılayıcı gen olarak bilinen Kiss1 geninin kodladığı ve C terminallerinde ortak RF-amid (Arg-Phe-NH₂) dizileri taşıyan 54, 14, 13 ve 10 aminoasitlik bir dizi proteinin, GPR54 reseptörüne bağlanarak agonist etki gösterdikleri bilinmektedir. Üremeden enerji metabolizmasına kadar geniş bir yelpazede fonksiyon gösteren RF amid peptidleri ailesinin üyeleri olarak tanımlanan kisspeptinler (54, 14, 13 ve 10), C terminallerinde 10 aminoasitlik aktif ve kisspeptin-10 olarak adlandırılan bir aminoasit dizisini taşırlar (Dhillon 2008, Kotani ve ark 2001).

Günümüzde GPR54 reseptörü ismi yerine Kiss1-R (kisspeptin reseptörü) terimi kullanılmaya başlamış ve kullanım giderek yaygınlaşmıştır. Bu proteinlerin öncülerini kodlayan Kiss1 geni ilk olarak insan malign melanoma hücre kültürlerinde "tümör metastaz baskılayıcı" bir gen olarak 1996 yılında izole edilmiş, en uzun sekansa sahip olan, insan melanom ve meme kanseri hücre kültürlerinde hücre üremesini baskılayıcı özelliği nedeniyle kisspeptin-54'de metastin olarak

adlandırılmıştır (Lee JH ve ark 1996, Lee DK ve ark 1999). Fizyolojik etkileri açısından kisspeptinler arasında doğal olarak oluşan reseptöre en güçlü şekilde bağlanan türün kisspeptin-10 olduğu konusunda görüş birliği olmasına karşın, farklı kisspeptinlerin değişik türlerde farklı etki gösterdikleri de öne sürülmektedir (Kotani ve ark 2001, Ohtaki ve ark 2001). Kisspeptinlerin etkileri ile kisspeptinlerin salınımını uyaran ya da durduran etkenler sırasıyla çizelge 1.3 ve 1.4’ te verilmiştir (Vila G 2010).

Çizelge 1.3. Kisspeptinin etkileri (Vila G 2010)

Hipotalamus ve Hipofiz	Diğer Organlar
GnRH sekresyonunun stimülasyonu üzerinden LH, FSH, östradiol ve testosteron düzeylerinin yükselmesi	Langerhans adacıklarında: insülin sekresyonunun uyarılması
Hipotalamusta POMC gen ekspresyonunun geriletilmesi	Böbrek üstü bezi kabuğunda: aldosteron üretiminin arttırılması
Hipotalamusta NPY gen ekspresyonunun arttırılması	Damarlarda: vazokonstriksiyon
Prolaktin sekresyonunun arttırılması	Meme kanserinde: TNF- α tarafından indüklenen hücre invazyonunun engellenmesi

Çizelge 1.4. Kisspeptin üretiminin regülasyonu (Vila G 2010)

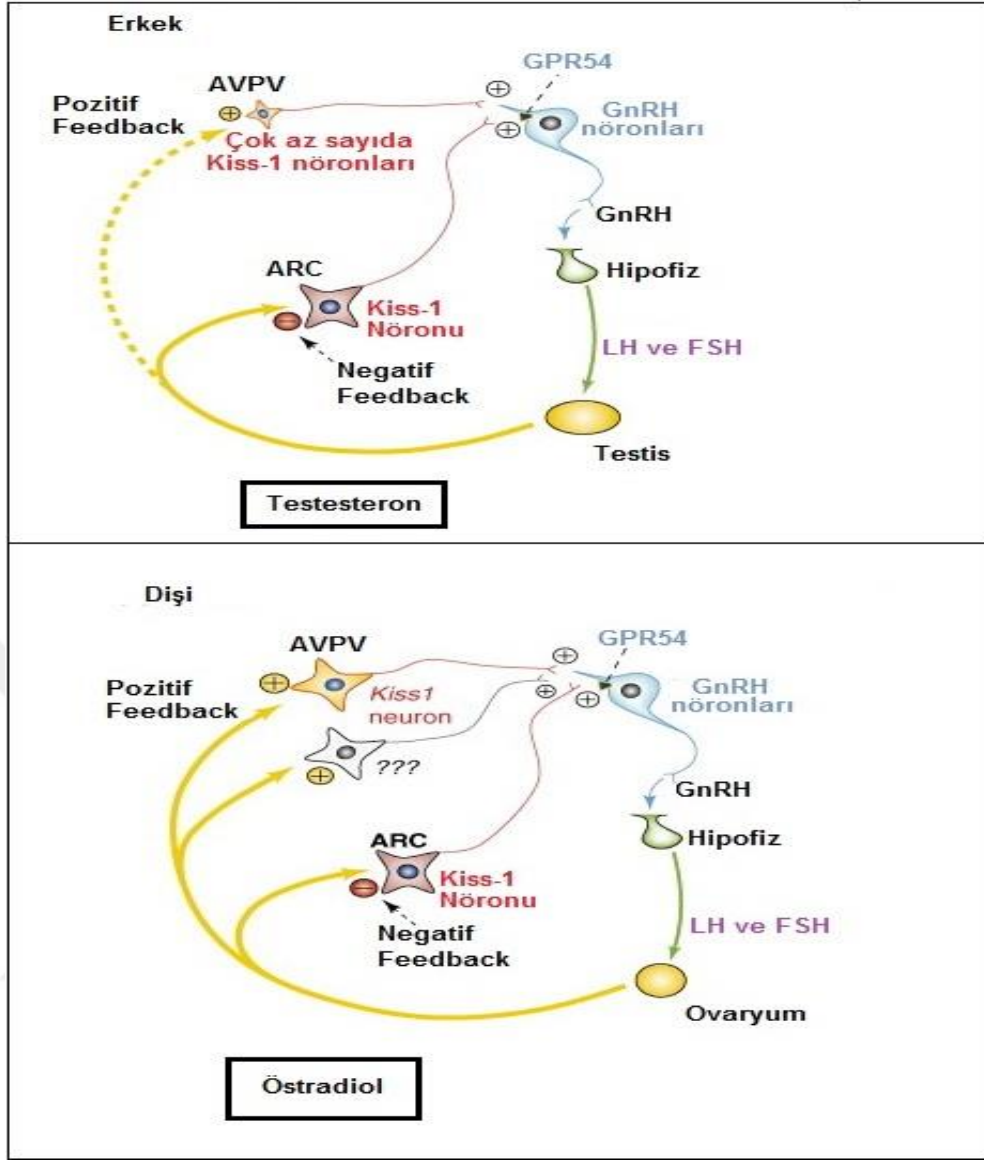
Stimülatörler	İnhibitörler
Leptin Melanokortin IGF-1 Gebelik	Yetersiz beslenme Hipoglisemi Psikolojik Stresler Lipopolikakkaratitler/yanıgsel olaylar Gherlin, CRH, Kortikosteroidler Endokrin bozukluklar Laktasyon

1.3.2. Kisspeptinin GnRH/LH/FSH Sekresyonu Üzerine Etkisi

Koyunlarda GnRH salınımından sorumlu nöronlar, başta cinsiyet steroidlerinin fonksiyonlarının etkileri olmak üzere aralarında fotoperiyot ve stresin de yer aldığı pek çok faktör tarafından etkilenmektedir. GnRH nöronlarında, gonadotropin salınımında rol oynayan östrojen reseptör alfa (ER α) ve progesteron reseptör ekspresyonlarının gerçekleştiğinden cinsiyet steroidleri ve GnRH sekresyonu arasındaki sinyal mekanizmasına farklı nöronların aracılık ettiği düşünülmektedir. Koyunlarda östradiol reseptörü bulunan hücrelerde, potansiyel nörotransmitterler arasında başlıca GABA, glutamat, nörokinin B, dinorfin ve kisspeptin yer almaktadır (Clarke ve ark 2009a, Smith ve Clarke 2010). Kisspeptin ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin GnRH nöronları ile etkileşim içerisinde oldukları ve GnRH nöronların tamamına yakınının Kiss1-R-mRNA ekspresyonu gerçekleştiği belirtilmektedir (Smith 2009a, Smith ve ark 2011).

Kisspeptin'in hızlı ve güçlü bir şekilde GnRH nöronlarını uyararak gonadotropin salınımını sağladığı bildirilmektedir (Han ve ark 2005, Messenger ve ark 2005). İnsan, kısırak, inek, koyun, keçi, rat gibi türlerde hem intraserebral hem de periferal kisspeptin uygulamaları plazma LH ile FSH düzeylerinde artışa yol açmaktadır (Caraty ve ark 2007, Dhillo ve ark 2007, Kadokawa ve ark 2008, Magee ve ark 2009, Thompson ve ark 2009, Hashizume ve ark 2010).

Kisspeptin'in Kiss1-R üzerine olan etkilerinin araştırılması aşamasında, kisspeptin uygulamasından önce GnRH ve kisspeptin antagonistlerinin, kisspeptin'in gonadotropin salgılatıcı etkisini bloke etmesi, kisspeptinin Kiss1-R aracılığı ile LH/FSH salınımına yol açtığını göstermektedir (Richard ve ark 2009, Millar ve ark 2010) Kisspeptin antagonistinin, kisspeptin'in GnRH nöronlarının uyarma oranını ve GnRH salınımını düşürdüğü, ancak (LH)'nın bazal düzeylerine değiştirmedeği belirlenmesi ile kisspeptinin LH salınım sıklığını düzenleyip LH sekresyonunu etkilese de, bazal LH düzeyinin kisspeptinden bağımsız bir mekanizma tarafından kontrol edildiği ileri sürülmüştür (Millar ve ark 2010).

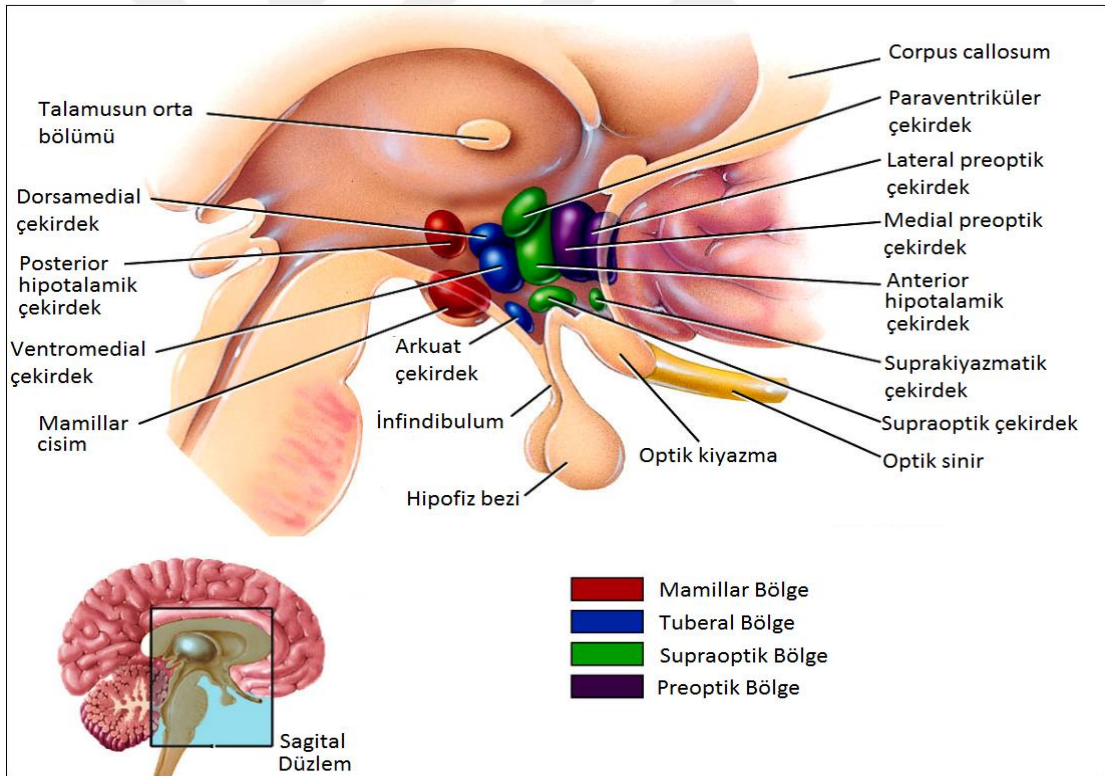


Şekil 1.4. Kisspeptinin etki mekanizması (AVPV: anteroventral periventricüler çekirdek, ARC: arkuat çekirdek) (Kauffman ve ark 2007)

Ratlarda kisspeptin'in doğrudan adenohipofizin gonadotrop hücrelerini etkileyerek LH ve FSH salınımını uyardıkları tespit edilse de, koyunlarda kisspeptin'in hipofize direkt etkisi tam olarak ortaya konulamamıştır (Smith ve ark 2008). Koyunlarda GnRH salgılayan hücrelerin % 90 ± 5 'inin Kiss1-r-mRNA ekspresyonu gerçekleştirdiği ve östrüs siklusunun folliküler döneminde ARC (arkuat çekirdek) ve POA (preoptik çekirdek) bölgelerinde Kiss1-mRNA ekspresyon artışının görüldüğü bildirilmektedir (Smith ve ark 2009b, Smith ve ark 2011). Arkuat çekirdekte bulunan kisspeptin popülasyonunun sayısal olarak POA'dakilere göre daha çok olduğu ve östrüs siklusunun dönemlerine bağlı olarak ARC kisspeptin hücre

sayılarının değiştiği, preovulatör LH pikini oluşturan geçici pozitif geri etkinin kisspeptin hücrelerinin aktivasyonundan ve ARC Kiss1 ekspresyon artışından hemen önce gerçekleştiği belirtilmektedir (Clarke ve ark 2009a, Smith 2009b, Smith ve Clarke 2010).

Anöstrüs döneminde, intravenöz yolla kisspeptin uygulamalarını izleyerek GnRH/LH'nin bazal düzeylerinin ani bir şekilde yükseldiği ve sonrasında da ovulasyonun gerçekleştiği bildirilmektedir (Caraty ve ark 2007). Anöstrüs döneminde östradiolün negatif geri etkisi ile LH sekresyonu baskılanırken kisspeptin uygulaması sonrasında bu etkinin ortadan kalktığı ve ovulasyonun gerçekleştiği belirtilmektedir (Clarke 2009a). Kisspeptin uygulamalarının, üreme ve anöstrüs dönemlerinde LH salınımına etkileri arasında farklılık bulunduğu, anöstrüs dönemde duyarlılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Smith ve ark 2009a, Smith ve ark 2011).



Şekil 1.5. Hipotalamik çekirdekler (<https://www.humanbrainfacts.org/hypothalamus.php>)

1.3.3. Kisspeptinin Mevsimsel Üremedeki Rolü

Koyunlarda hipotalamusun bazal premammillar nükleusunda bulunan melatonin, mevsime bağılı üremenin kontrolünde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu hormonal sinyalin nasıl GnRH sekresyonuna dönüştüğü tam olarak aydınlatılamamıştır (Goodman ve ark 2010). Kisspeptin hücrelerinin bu hormonal sinyallerin GnRH'a dönüşüm mekanizmasında etkin bir rol alabilecekleri düşünülmektedir (Clarke ve ark 2009a).

Beynin ARC bölgesinde ER α ekspresyonu yapan nöronların A15 nükleusu ile etkileşim içerisinde kisspeptin hücrelerinin östradiol sinyallerini dopaminerjik nöronlara ilettiği, birlikte mevsimsel üremede önemli görevler aldıkları ve A15 nöronlarının kisspeptin nöronlarını inhibe ederek GnRH salınım sıklığını baskıladığı düşünülmektedir (Clarke ve ark 2009a, Goodman ve ark 2010).

Mevsime göre ARC'de bulunan kisspeptin hücrelerinin, östradiole olan duyarlılıklarında değişmelerin olduğu ve bu sayede kisspeptinin mevsimsel üremede etkin bir rol alabileceği vurgulanmış (Smith ve ark 2008, Wagner ve ark 2008), üreme döneminde mediobazal hipotalamus bölgesindeki GnRH nöronları ile etkileşim içerisinde olan Kiss1 varlığının üreme döneminde 2 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Smith ve ark 2008, Clarke ve ark 2009a).

Suriye fareleri ile yapılan çalışmalar, mevsimsel üreme ve kisspeptinler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmış ve gün ışığının azalmasının arkuat çekirdekte Kiss1-mRNA seviyelerinin düşmesine sebep olduğu belirtilmiştir (Simonneaux ve ark, 2009).

1.3.4. Kisspeptin ve Üremenin Metabolik Kontrolü

Kisspeptin-GPR54 sistemi üzerinde mevsimsel üreme konusunda melatonin etkileri olduğu gibi üremenin metabolik düzenlenmesi konusunda da leptinin etkileri tartışılmaktadır. Kısırlaştırılmış erkek farelerde yapılmış bir çalışmada (Smith ve ark 2006a), kisspeptin eksprese eden nöronların yaklaşık yarısında leptin reseptörlerinin de lokalize olması, kisseptin nöronlarının leptinin doğrudan hedeflerinden biri olduğunu ve bu nöronların üremenin metabolik düzenlenmesinde rol alabileceklerini düşündürmüştür. Leptin yetersizliği olan farelerde açlık merkezinin baskılanamaması sonucu obezitenin gelişmesi, normal genetik yapıdaki farelere göre arkuat

çekirdeklerinde Kiss1- mRNA düzeylerinde azalma görülmesi, koyunlarda da arkuat çekirdek ve preoptik alandaki kisspeptin nöronlarında leptin reseptörleri bulunması ve bu reseptörlerin leptin ile uyarılabilmesi, üremeyi etkileyen faktörler ile enerji dengesi, adipoz doku fonksiyonları ve iştahgibi metabolik konularla kisspeptin nöronları arasındaki ilişkilerin incelenmesi konusunu daha da ilginç hale getirmiş ve yoğun olarak araştırılmaya başlanmıştır (Smith ve ark 2006a, Smith ve ark 2006b).

1.3.5. Kisspeptin ve Fotoperiyot

Koyunlarda ve kemirgenlerde yapılan aydınlık ve karanlık kontrollü çalışmalar kisspeptin profilindeki değişimlerin başlıca etkisinin fotoperiyot kaynaklı olduğunu ifade etmektedir (Revel ve ark 2007, Wagner ve ark 2008, Simonneaux ve ark 2009, Chalivoix ve ark 2010). Kısa gün periyodundan uzun gün periyoduna geçiş döneminde koyunlarda arkuat çekirdekteki Kiss1-mRNA ekspresyonu azalma gösterirken (Wagner ve ark 2008), tersine uzun gün periyodundan kısa gün periyoduna geçişte arkuat çekirdekteki kisspeptin nöronları sayısında belirgin artış gözlenmiş, fotoperiyodik etkilerin epifiz bezinde melatonin salınımıyla oluşan bir nöroendokrin sinyal sayesinde gerçekleştiği bildirilmiştir (Chalivoix ve ark 2010).

Melatoninin koyunlarda etki gösterdiği premamillar ve mediobasal hipotalamik alanlar (Malpoux ve ark 1993, Malpoux ve ark 1998) lokasyon olarak arkuat çekirdekteki kisspeptin nöronları ile birbirine yakın pozisyonadırlar. Fotoperiyot ve kisspeptin arasındaki ilişki araştırılırken geliştirilen tezlerden birisinde, A15 bölgesinde bulunan ve LH pulzasyon inhibitörü olarak etki gösteren dopaminerjik nöronların, östrojene bağlı olarak etkilerini sadece anöstrus döneminde gösterdiği belirtilmiştir (Meyer ve Goodman 1985, Meyer ve Goodman 1986, Havern ve ark 1994, Goodman ve ark 2010). Östradiol'ün FOS protein ekspresyonuyla A15 bölgesindeki dopaminerjik nöronları anöstrus döneminde uyarabildiği, östrus döneminde etkili olmadığı, keza dopaminerjik nöronların arkuat çekirdek ve kisspeptin nöronlarıyla etkileşime girdikleri bildirilmiş (Havern ve ark 1991), koyunlardaki kisspeptin nöronlarının anöstrus döneminde LH pulzasyonlarının inhibisyonundan sorumlu dopamin reseptörünü (DRD2) engellerken, DRD2 antagonistlerinin anöstrustaki koyunlarda LH pulzasyonunu arttırdığını, buna karşın aynı koyunlara uygulanan kisspeptin antagonistlerinin

kisspeptin'in ovulasyon üzerindeki etkisini tamamen bloke ettiği ortaya konmuştur (Goodman ve ark 2012) .

1.3.6. Kisspeptin ve Leptin

Adipöz dokuların büyük bir endokrin organ gibi görev aldıkları ve adipöz hücrelerin senkronize pulzasyonla salgıladıkları leptinin merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere psikolojik fonksiyonlarının etkili bir biçimde yerine getirilebilmesi için gerekli olduğu bildirilmiştir (Smith ve ark 2006a).

Leptinin fertilité ve kisspeptin ekspresyonu üzerindeki rolünü araştırmak üzere ob/ob vahşi tip fareler üzerinde yürütölen çalışmada leptin defektli farelerde normal farelere göre hipotalamusun arkuat çekirdek bölgesinde gerçekleşen Kiss1-mRNA ekspresyonu belirgin ölçüde düşük çıkarken, leptin takviyeleri ile bu ekspresyonlar ve kisspeptin üretimi yükselmiş, leptin uygulamalarıyla düşük olan Kiss1-mRNA seviyeleri belirli bir ölçüde yükseltmesine karşın kisspeptini normal düzeylerine ulaştıramamıştır. Leptin ilavesinden sonra arkuat çekirdekte Kiss1-mRNA ve leptin reseptörü (Ob-R) ekspresyonu incelendiğinde arkuat çekirdek nöronlarının yaklaşık yarısında bu ekspresyonların eř zamanlı olarak arttığı gözlemlenmiş ve bu olgunun leptinin kisspeptin ile doğrudan ilişkisi olabileceğinin işareti olarak değerlendirilebileceği ve kisspeptin üzerinden GnRH stimölasyonunun sağlanabileceği öne sürölmüştür (Smith ve ark 2006a). Benzer bulgulara kastre edilmiş koçlarda da ulaşılmış, düşük ya da normal vücut ağırlığına sahip hayvanların arkuat çekirdek, anteroventral periventriküler çekirdek ve preoptik alanda izlenen Kiss1 ekspresyonları karşılaştırıldığında zayıf hayvanlardaki düzeylerin normal hayvanlara göre daha düşük çıkmasının zayıf hayvanlarda leptinin daha az salgılanmasından kaynaklandığı düşünölmüş ve leptin verilmesinden sonra Kiss1 ekspresyonunun arttığı, ancak farelerde olduğu gibi normal düzeylerine erişemediği saptanmıştır. Pubertanın aktivasyonunda leptinin hipotalamik çekirdekler bölgesinde kisspeptin üretimini direkt olarak etkilemediği, ancak ventral premamillar çekirdek bölgesinde puberta girişi yavaşlatan ya da aksatan unsurları baskılayıcı etki gösterdiği, aynı zamanda leptinin, Kiss1-R ekspresyonunda görev alan arkuat çekirdek nöronları ile leptin arasında mediatörlük yapan pSTAT3'ün üretimini indüklediği bildirilmiştir (Cravo ve ark 2011, Donato ve ark 2011). Backholer ve ark

(2010) da kisspeptin ile leptin arasındaki doğrudan bir bağlantı varsayımının henüz doğrulanmadığını bildirmektedirler.

Transgenik farelerde puberta öncesi ya da puberta başlangıcında hiptolamik çekirdek bölgelerinde Kiss1 ve Ob-R nin ko-ekspresyonu görülemezken, seksüel olgunlaşmayı izleyerek ekspresyonların şekillendiği, bu olguyu leptinin kisspeptin nöronlarını etkileyerek kisspeptin salınımını uyarmasının ortaya çıkardığı belirtilmiş, leptinin tek başına GnRH salınımını stimüle edemediği ve kisspeptine bağımlı olduğu bildirilmiştir (Donato ve ark 2011, Cravo ve ark 2013).

1.3.7. KNDy Hipotezi

İnsanlarda ve ratlarda 1990'lı yıllarda yürütülen çalışmalarda ovulasyonun arkuat çekirdekteki nörokinin B (NKB) ekspresyonu ile artan LH konsantrasyonlarının ovulasyonu başlattığı saptanmış, ancak sistemin nasıl çalıştığı tam olarak açıklanamamıştır, koyunlarda sürdürülen çalışmalarda dinorfin nöronlarının anatomik olarak NKB nöronlarına yakın olması yanı sıra her iki nöron türünün de östradiol ve progesteron reseptörleri içerdikleri tespit edilmiş, kisspeptin hormonunun keşfiyle birlikte de yapbozun eksik parçasının yerine oturduğu, ovulasyonun dinorfin, NKB ve kisspeptin nöronlarının işbirliği sonucunda oluştuğu öne sürülmüş ve bu olguya KNDy hipotezi adı verilmiştir. (Rance ve Young 1991, Rance ve Bruce 1994, Goubillon ve ark 2000, Foradori ve ark 2006, Goodman ve ark 2007, Navarro ve ark 2009).

Birbirinden bağımsız dört farklı araştırma grubunun (Navarro ve ark 2009, Lehman ve ark 2010, Maeda ve ark 2010, Rance ve ark 2010) yaptığı çalışmalarla elde ettikleri, birçok türde kisspeptin, nörokinin ve dinorfinin nöron popülasyonunun varlığı (Navarro ve ark 2009, True ve ark 2011), insanlarda NKB ve kisspeptinin GnRH salınımında aldığı kritik rol (Topaloglu ve ark 2009), ratlarda kisspeptin antagonistlerinin uygulanmasıyla episodik LH sekresyonu için endojen kisspeptine duyulan ihtiyaç ve maymunların median eminensinde kisspeptin ve LH sekresyonu arasındaki korelasyonun gösterilmesi (Keen ve ark 2008), keçilerde kisspeptin uygulamasıyla KNDy nöron bölgesinde gözlemlenen multi ünite aktivitesinin tespiti gibi sonuçlar KNDy hipotezinin oluşmasında etkin olmuştur (Ohkura ve ark 2009).

KNDy olgusu araştırılırken önceleri kisspeptinin GnRH salınımı için tek başına yeterli olduğu, salınımın KNDy ağının regülasyonunda lokomotif rol oynadığı ileri sürülmüş, bu kanının oluşmasında kisspeptinin LH pulsları için sahip olduğu kritik önem ve GnRH nöronlarındaki Kiss1 reseptör varlığı etkili olmuştur (Irwig ve ark 2004, Han ve ark 2005, Smith ve ark 2009b). Bunun aksine koyunlarda bir yanda KNDy nöronlarının Kiss1-R içermemesi, diğer yandan eksojen kisspeptin uygulamalarının KNDy bölgesinde multi unit aktivitesi göstermemesi, kisspeptinin KNDy sisteminin regülasyonunda rol almadığını düşündürmüştür (Kinsey-Jones ve ark 2008, Ohkura ve ark 2009, Smith ve ark 2011).

İlerleyen zamanda KNDy nöron bölgesinde NK3R reseptörünün bulunduğu ve bazal düzeyde GnRH salınımını başlattığı öne sürülmüş, ancak bazal düzeyde seyreden GnRH'nın östrus için gerekli olan LH pikini sağlayamadığı, kısa gün periyodunun başlamasıyla birlikte östrojenin pozitif feedback etkisiyle, ARC deki kisspeptin varlığının hızla artarak GnRH piklerine, bu GnRH piklerinin de LH piklerinin oluşumunu sağladığı bildirilmiş, GnRH pulslarının sonlarına doğru salınan dinorfin'in de KNDy ağını engelleyerek GnRH salınımını tekrar durdurduğu yazılmıştır (Navarro ve ark 2009, True ve ark 2011). Ancak KNDy nöronlarının dinorfin reseptörü (KOR: k-opoid reseptör) içerip içermediği tam olarak ortaya konamadığı için dinorfin etkisinin KNDy nöronları üzerinden gerçekleştiği tezinin kesin olmadığı, fakat koyunlara i.v. yolla uygulanan naloxonun (KOR antagonisti) GnRH pulzasyon süresini uzatmasının ise dinorfinin GnRH salınımını üzerinde kesin inhibe edici bir etkisininin kanıtını oluşturduğu belirtilmiştir (Navarro ve ark 2009).

1.3.8. Kisspeptin ve Anöstrus

Anöstrus olgusu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, koyunların üreme sezonunun sonlanmasından sonra yapay olarak şekillenen kisspeptin sinyallerindeki artışın, GnRH salınımını tekrar başlatıp anöstrus sezonunda pasif halde olan gonadotropik aksisi tekrar aktif hale getirilebileceği konusunda güçlü kanıtlarla karşılaşılmaktadır. Caraty ve ark (2007) anöstrustaki koyunlara intravenöz yoldan 48 saat süreyle kisspeptin uygulamasıyla gonadotrop hattın aktivasyonunda artan LH düzeylerinin etkisiyle folliküler fazın uyarıldığını ve ovulasyonun başladığını saptamışlardır. Seberty ve ark (2010) kisspeptinin ovulasyonu uyarabilmesi için östradiol seviyelerinin yükselmesinin ön gereksinim olduğunu bildirirken, Smith

ve ark (2011) ovulasyonunun başlatılabilmesi için kisspeptinin GnRH nöronlarını doğrudan etkilemesinin yeterli olacağını belirtmişler, koyunlarda kisspeptin nöronlarının hipotalamusun median hattının internal alanından eksternal alanına doğru uzandığını, bu nöronların kan-beyin bariyerinin dış kısmında GnRH terminalleriyle etkileşime girerek GnRH stimülasyonunu gerçekleştirdiği düşünmüşler ve periferik kan dolaşımındaki kisspeptinin beyin kapıllarlarına geçerek GnRH terminallerini uyarabileceği olasılığının bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Anöstrusta koyun sürülerinde bulunan steril koçların feromonlarının uyarılarıyla salınan GnRH etkisiyle follikül olgunlaşmasının ve ovulasyonun devreye girdiği ve doğal yoldan şekillenen bu koç etkisi ile eksojen kisspeptin tedavilerinin oluşturduğu etkilerin benzerlik gösterdiği öne sürülmüştür (Hawken ve ark 2009, Delgadillo ve ark 2009). De Bond ve ark (2013)'da anöstrustaki koyun sürülerine koç katımı ile birlikte arkuat çekirdekte aktive olan kisspeptin nöronlarının sayısında bir artışın gözlemlendiğini yazarlarken, Sakamoto ve ark (2013) ise kisspeptin antagonistleri uygulanan sürülerde koç etkisinin tamamen ortadan kalkmasının kisspeptin'in östrus ve ovulasyon için gerekliliğini ortaya koyduğunu bildirmektedirler.

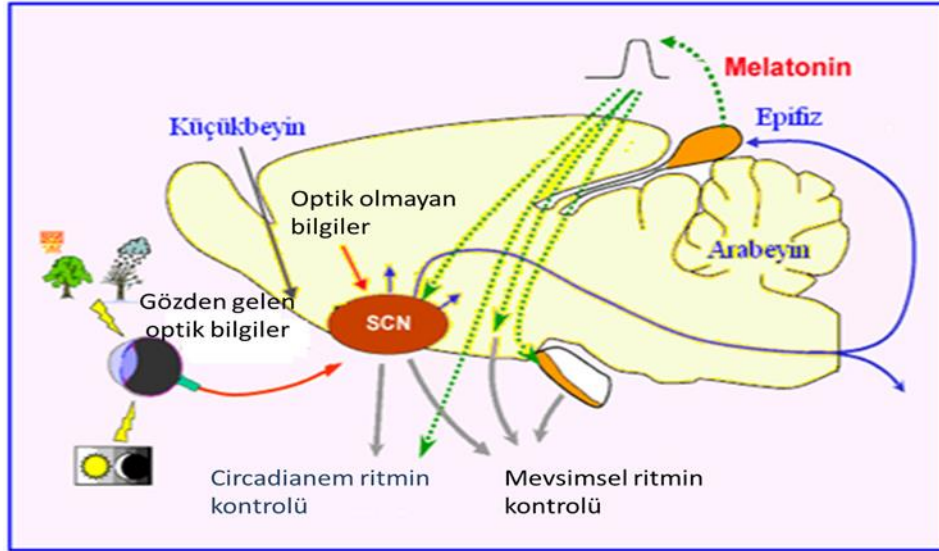
1.4. Melatonin

1.4.1. Melatoninin Tarihçesi

Bir dermatolog olan Lerner ve ark (1959) 1958 yılında başladıkları araştırmalarında kurbağa ve balıkların pineal ekstraktlarında deri renginin açılmasına yol açan bir maddeyi izole etmişler, bu maddenin insan derisinin pigmentasyonunda da rolü olabileceğini düşünmüşler ve bu düşüncelerini sığır epifiz bezlerinde yağların uzaklaştırılmasından sonra etil asetat putrifikasyonu ile melatoninin elde edilmesiyle kanıtlamışlardır, keza kafeinle derileri koyulaştırılmış kurbağalarda melatoninin deri rengini açarak normal rengine döndürdüğünü gözlemişler ve sürdürdükleri çalışmalarlarıyla melatoninin biyokimyasal yapısını ve fotoperiyodik etkisini ortaya koymuşlardır.

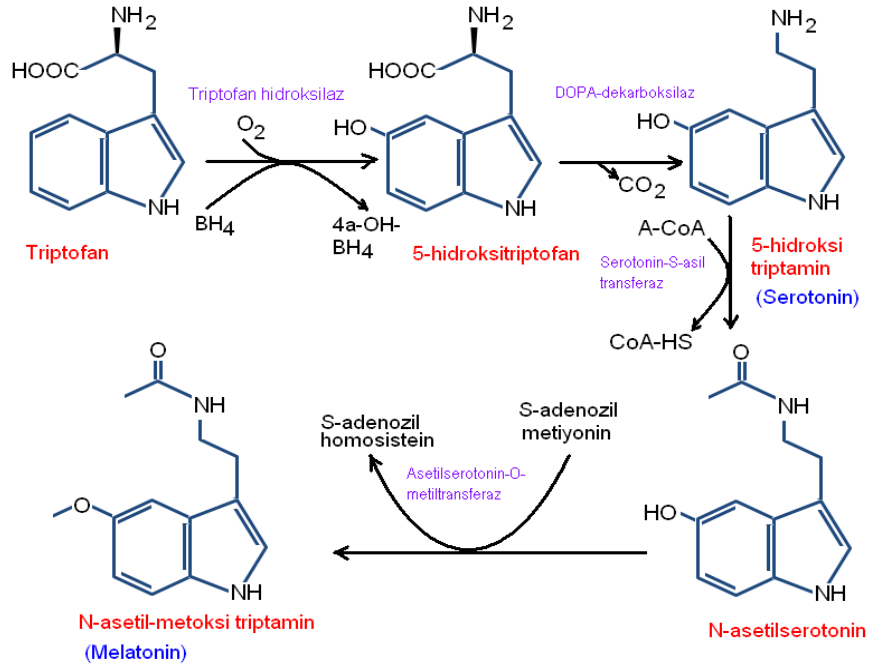
1.4.2. Melatoninin Sentez ve Metabolizması

Endojen melatoninin büyük oranda epifizde sentezlendiği ve epifizin biyosentezden sorumlu tek organ olduğu bilinmekle beraber son yıllarda özellikle diffuz nöroendokrin sistemin bir parçası olarak kabul edilen APUD (Amine Precursor Uptake Deamin) hücrelerinde de önemli miktarlarda melatonin bulunduğu belirlenmiştir (Üstündağ ve Canatan 1999). Epifiz bezinin yanı sıra gastrointestinal (GIS) kanalda bulunan enterokromaffin hücrelerinde, retina, dalak, eritrosit, lökosit, timus, tiroid, plasenta, endometriyum ve neoplastik dokularda melatonin sentezlediği ileri sürülmekte ve melatoninin gün içinde kanda görülen ritminin epifiz bezinde sentezlenip salınan melatonine bağlı olduğu bildirilmektedir. (Hattori ve ark 1995, Paredes ve ark 2009). Ayrıca sinir sisteminde bulunan reseptörlerinde melatonin gibi sirkadiyan bir ritimle çalıştığı gözlenmiş (Cardinali ve ark 1997), endokrin bezlerin çoğunluğunun oluşturdukları hormonları depolarken, epifiz bezinin pinealositlerinin sentezledikleri hormonları komşu kapillere verdikleri, melatoninin yüksek lipofilik niteliğiyle hızla kana geçtiği, beyin omurilik sıvısında dahil tüm vücut sıvılarına ve dokularına dağıldığı, genellikle 21.00-22.00 saatlerinde başlayan melatoninin salınımının, 02.00-04.00 saatleri arasında en üst düzeylerine ulaştığı, 07.00-09.00 arasında ise tekrar azalmaya başlaması nedeniyle kan ve hücre içi melatoninin düzeylerinin geceleri gündüze göre 3-10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Reiter 1991). Işınlardan etkisiyle oluşan impulsların retinadan hipotalamusun nukleuslarına (Suprachiasmatic Nucleus (SCN) ve Paraventricular Nucleus (PVN) oradan da median ön beyin demeti (MÖD) ve retikuler formasyon yolu ile önce medulla spinalise daha sonra da superior servikal gangliona (SCG) aktarıldığı, sinirsel yolla uyarılan pinealositlerde melatonin sentezinin triptofanın enzimatik reaksiyonlarla serotonine ve daha sonra melatonine dönüşümü ile gerçekleştirildiği saptanmıştır (Gastel ve ark 1988, Klein ve ark 1997, Klein 2007).



Şekil 1.6. Melatonin sekresyonunun regülasyonu. (<http://www.biokurs.de/melatde.htm>)

Kan dolaşımı ile epifize gelen triptofan, önce triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenerek 5-Hidroksi Triptofan'a; 5- Hidroksi Triptofanda DOPA-dekarboksilaz enzimi etkisiyle karboksil gruplarını kaybederek serotonine (5-Hidroksi Triptamin) dönüşür (Gastel ve ark 1988, Klein ve ark 1997, Klein 2007).



Şekil 1.7. Triptofan'dan melatonin biosentezi (Alan K. 2009)

Daha sonra serotonin, serotonin asil Transferaz enziminin gerçekleştirdiği asetilasyon ile N-Asetil serotonine; N-Asetil serotonin de asetilserotonin-O-Metil

Transferaz enzimi etkisi ile metilasyona uğrayarak melatonine (N-Asetil 5- Metil Triptamin) dönüşür (Gastel ve ark 1988, Klein ve ark 1997, Klein 2007)

Epifize ulaşan sempatik impulslar, ışık şiddeti ve süresine göre epifiz bezindeki melatonin salınımını azaltır veya artırır. Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkta depolarize olarak melatonin sentezini başlatırlar (Perreault-Lenz ve ark 2003). Gün batımıyla fotoreseptör hücrelerden salgılanan norepinefrin, hem triptofanın dolaşımından beze girişini artırmakta ve hem de β -reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, cAMP (siklik adenozin monofosfat) seviyelerini yükseltmektedir. Melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı olan serotonin asil transferaz enzim aktivitesi ve salgılanan melatonin miktarının, cAMP etkisiyle kontrol edildiği bildirilmiştir (Schomerus ve Korf 2005).

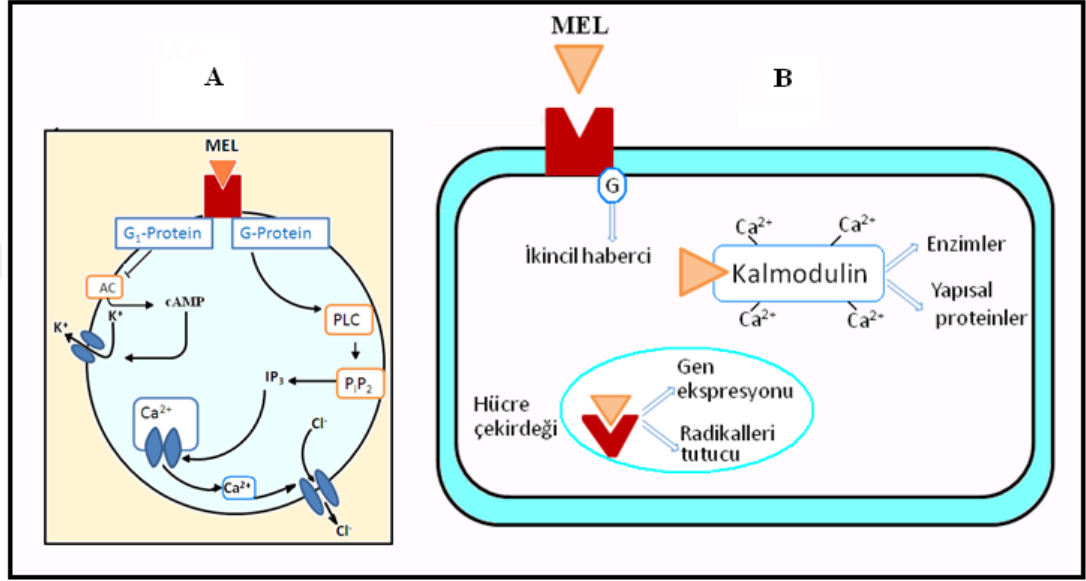
Pinealositler tarafından sentezlenen melatonin kendine özgü doğası sayesinde epifiz bezinden kolayca dışarı çıkmakta, kan beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemine ve kan dolaşımına geçebilmektedir (Hardeland 2009a, Leston ve ark 2009). Merkezi sinir sistemindeki melatonin beyinde bulunan sitokrom P450 monooksijenaz enzimlerinin izoformlarıyla metabolize edilmektedir (Ma ve ark 2005, Pandi-Perumal ve ark 2006). Bu izoformlardan CYP1A2 ve CY2C19 enzimlerinin her ikisi de melatonini N-asetil-serotonine demetilize edebilir ya da melatoninin hidrosilasyonu ile 6-hidroksimelatonine dönüştürdükten sonra sulfatize ederek 6-sulfatoksimeletonine dönüştürülebilir (Beck ve Jonsson 1981).

Melatonin oluşumunda prekürsör olan N-asetilserotoninin de insanlarda melatonin metaboliti olduğu bulunmuş, hidrosilasyonla oluşan en önemli yıkılım ürününü 6-hidroksimelatoninin, çoğunlukla sülfatla ve daha az olarak glukuronik asitle konjuge olarak idrarla atıldığı ve idrar 6-sulfatoksimeletonin düzeylerinin serum melatonin konsantrasyonu ile yakın ilişkili olduğu bildirilmektedir (Beck ve Jonsson 1981, Hardeland ve ark 2009b, Hardeland 2010).

1.4.3. Melatonin Reseptörleri

Merkezi sinir sistemi, karaciğer ve bağırsaklarda melatonin reseptörleri çekirdekte bulunurken genital organlarda hücre membranlarında da bulunur (Witt-Enderby ve ark 2003). Bugüne kadar melatoninle ilgili 3 tip memeli reseptörlerinin (ML1, ML2 ve ML3) varlığı gösterilmiştir. Bunlardan ikisi G proteini ile birleşen

reseptörlerdir ve ML1 ve ML2 olarak ifade edilirler, son yıllarda saflaştırılmış olan MT3 protein quinone redüktaz sınıfındadır (Witt-Enderby ve ark 2003). ML1 reseptörleri yüksek affiniteli bağlanma bölgelerine sahip a, b, c alt tiplerinin varlığı gösterilmiştir. ML2 reseptörü ise düşük affiniteli bağlanma bölgeleri ile karakterizedir (Beyer ve ark 1998) ve ML3’de ise ML2’ye benzer bağlanma profili göstermektedir (Witt-Enderby ve ark 2003).



Şekil 1.8. Zarda yer alan (A) ve intraselüler (B) melatonin reseptörleri sayesinde olası sinyal taşınması yollarının şematize gösterilişi: A ile simgelenen şekilde melatoninin uygun reseptörüne bağlandıktan sonra reseptörle bağlantılı guanin nükleotid bağlayıcı protein (G protein) aktive edilir. Bir G1 proteini ya forskoline aktive edilen adenil siklazı (AC) baskılar ve bu şekilde ATP (adenozin trifosfat) 'ın cAMP ye dönüşümü engellenir. Bu sayede ekstraselüler boşluğa K^+ çıkışı artar ya da G₁ proteini fosfolipaz C enzimini (PLC) uyarır ve inozitol trifosfatın (InsP₃) artan miktarlarda oluşumu sağlanır. InsP₃ kalsiyum iyonlarını intraselüler depolardan serbest bırakır ve klorun dışarı doğru çıkışı aktive edilir. B ile simgelenen şekilde melatonin hücre zarından geçtikten sonra kalmodule bağlanır ve bu sayede sitoskelet etkilenir. Melatonin ayrıca hücre içindeki reseptörlerinede bağlanabilir ve bu bağlanma bölgeleri retinoid reseptör grubuna dahildir (Tanja 2003)

1.4.4. Melatonin ve GnRH/LH Aksisi

Melatoninin GnRH / LH hattındaki etkilerinin aydınlatılması ve melatonin bağlanma bölgelerin belirlenmesi amacıyla yoğun bir şekilde yürütülen çalışmalarında Lincoln ve Maeda (1992) koyun beyninin farklı bölgelerine yerleştirilen implantların melatonin hormonunun mediobasal hipotalamus bölgesinde etkinlik gösterdiğini ve gonadotropin salınımını tetiklediği tespit etmişler, ancak adı geçen araştırmacılar sürdürdükleri bir başka araştırmalarında GnRH sentezleyen hücrelerin çokça lokalize olduğu preoptik alanda melatoninin GnRH / LH hatını harekete geçiremediğini de saptamışlardır (Lincoln 1994). Malpoux ve ark (1998) otoradyografi ve mikro-implantasyon yöntemleriyle preamillar hipotalamus (PMH) bölgesinde yüksek oranda melatonin bağlayıcı alanların varlığını ve melatonin hormonunun bu bölgeye ulaşarak LH sekresyonunu indükleyebileceğini gözlemişler, Tricoire ve ark (2002) PMH hücrelerine karşı yüksek bir affiniteye sahip melatoninin iyi bir difizyon kabiliyeti sayesinde üçüncü ventrikulün pineal geçişlerinden ventral bölgelerine kolaylıkla ulaşabildiğini ve GnRH nöronlarıyla etkileşim içerisinde olan PMH bölgesinde GnRH/LH aksisini başlatabileceğini bildirmişlerdir.

Koyunlarda mevsime bağlı üremenin kontrolünde melatonin sinyallerinin GnRH sekresyonuna nasıl dönüştüğü halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Goodman ve ark 2010). Son yıllarda çokça araştırma konusu olan ve melatoninin bulunduğu mediobasal hipotalamus bölgelerinde ve preoptik alanda aktivite gösterdiği keşfedilen kisspeptinin bu hormonal sinyallerin GnRH'a dönüşüm mekanizmasında etkin bir rol alabileceği de düşünülmektedir (Clarke ve ark 2009a).

1.4.5. Melatoninin Nörosteroidlerle Etkileşimi

Waseda Üniversitesinde bazı nörosteroidlerin merkezi sinir sisteminde kolesterolden sentezlendikleri, bazılarının hücre zarında yer alan iyonotropik reseptörler üzerinden iyon akışını değiştirerek sinapslarda bilgi transferini sağlarken (Genomik olmayan etki), bazılarının da intranükleer reseptörler üzerinden beyin hücrelerinin gelişimini ve sinapslardaki bilgi alışverişini hızlandırdıkları saptanmış, öğrenme ve bilgi depolama mekanizmasından sorumlu olan nöronların yapısını oluşturan purkinje hücrelerinin serebellar kortekste lokalize oldukları ve uyarımların iletiminin temelini sinirsel devreler arasındaki nörotransmitter madde değişimlerine dayandığı belirtilmiştir (Tsutsui K ve ark 2006,

Tsutsui K 2008a). Adı geçen üniversitede devam eden çalışmalarla semender ve bildircinların beyinde keşfedilen 7 α -hidroksipregnenolon ile melatonin sentezi arasındaki ilişkilerin lokomotor aktivitelerin spontan ritmik değişimini ortaya çıkardığı, güvercinlerde gündüz daha fazla salınan 7 α -hidroksipregnenolonun spontan lokomotor aktiviteleri artırırken geceleri daha fazla salınan melatoninin 7 α -hidroksipregnenolonun sentezini baskılayarak lokomotor aktiviteyi azaltmasına karşın, geceleri harekete geçen semender kurbağalarında melatoninin karanlık periyotta 7 α -hidroksipregnenolon sentezini uyardığı ve spontan lokomotor aktivite artışını sağladığı bildirilmektedir (Tsutsui ve ark 2008b, Tsutsui ve ark 2009).

1.4.6. Melatonin ve Reprodüksiyon

Sıcak ekvatorlardan soğuk kutuplara kadar uzanan değişik bölgelerde yaşayan pek çok memeli hayvan türleri, yılın mevsimlerine göre fertil ve infertil evrelere girmektedirler. Fotoperiyod etkisiyle şekillenen mevsimsel çiftleşme evreleriyle doğacak yavrunun yaşama şansı en yüksek olan dönemlerde doğması sağlanır. Diurnal canlıların üreme dönemi mevsimin en uzun günlerine denk gelirken, nokturnal canlılar için bu dönem kısa gün periyoduna denk gelmektedir. Fotoperiyoda göre ayarlanan çiftleşme mevsimi gelince, epifiz bezinden salınan melatonin hipotalamus ve hipofiz aracılığıyla gonadları aktive ederken, çiftleşme mevsiminin geride kalmasıyla birlikte, hipofizin aktivitesinin baskılanmasıyla gonadal aktivite de gerilemektedir. Kobaylarda ve koyunlarda hipotalamusun suprakiazmatik nükleusu zedelendiğinde hayvanların günlerin uzunluğunu tam olarak algılayamamalarının ve mevsimsel siklus düzeninin bozulmasının melatoninin reprodüksiyon mekanizması üzerindeki hayati rolünü ortaya koyduğu ve epifizin biyolojik bir saat gibi çalıştığına kanıtı olarak değerlendirilmiş ve dış ortam ışığındaki değişimlerin oluşturduğu sinirsel uyarımların hormonal uyarımlara dönüştürülerek seksüel siklusların kontrolünde rol oynadığı saptanmıştır (Domanski ve ark 1980, Tamarkin ve ark 1985, Bubenik ve ark 1998).

1.4.7. Melatonin, Çinko ve TSH

Melatonin üretiminin yapıldığı organ olan epifiz ile tiroid bezi arasında bir ilişki bulunabileceği ve bu ilişkinin TSH'nın melatonin tarafından stimülasyonu üzerinden gerçekleştirilebileceği düşünülmüş, ancak bu konuda yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlara ulaşılmıştır. Bazı araştırma sonuçlarına göre melatonin ve epifiz

bezinin tiroid fonksiyonları üzerinde inhibitör etki gösterdiği sonucuna ulaşılrken (Wajs ve Lewinski 1992, Wright ve ark 1997), bazı araştırmalarda ise bu olgunun günün saatlerine göre değiştiği, sabah saatlerinde görülen sitümüle edici etkinin gece saatlerinde tersine dndği ve inhibitrik bir etkinin geliştiği ne srlmştır (Kniazewski ve ark 1990, Zwirska-Korczala ve ark 1991).

Çinko'nun hormon-reseptör etkileşimi üzerinden birçok hormonun aktivasyonunda önemli rol oynadığı, bu konudaki araştırmaların yoğun bir şekilde srdrldği bilinmektedir (Prasad 1991, Valle ve Falchuk 1993). Hipotiroidizm olgularında çinko seviyelerinin düşük, hipertiroidizm olgularında çinko seviyelerinin yüksek çıkması ile hormon-reseptör kompleksi üzerinden en belirgin şekilde etkilenen hormonun da TSH olduğu ortaya konmuştur (Leblondel ve ark 1992, Baltacı ve ark 2003). Baltacı ve ark (2003) farelerde çinko, melatonin ve TSH ilişkisini kontrol (K), inkoermeyen diyetle beslenen (I. Deneme grubu), pinealektomili (II. Deneme grubu) ve pinealoktemili ve çinkodan noksan diyetle beslenen (III. Deneme grubu) farelerde çinko, melatonin, TSH, serbest ve total T3 ve T4 düzeylerini ölçmüşler, çinkodan yoksun diyetle beslenen, pinealektomili ve pinealektomi yanı sıra yetersiz çinko ile beslenen grupta hem Zn hem de melatonin düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistik açıdan önemli düzeyde dştği bulunduğunu bulmuşlardır (izelge 1.5).

Çizelge 1.5. Kontrol ve deneme gruplarında plazma çinko ve melatonin düzeyleri.

GRUPLAR	Zn ($\mu\text{g/dL}$)	Melatonin (pg/mL)
Kontrol Grubu	121.30 \pm 9.94 ^a	18.73 \pm 8.00 ^a
I. Deneme Grubu	47.54 \pm 28.49 ^c	10.36 \pm 3.57 ^b
II. Deneme Grubu	74.55 \pm 7.19 ^b	3.88 \pm 1.46 ^c
III. Deneme Grubu	43.88 \pm 9.53 ^c	2.81 \pm 1.84 ^c

(p<0,01) a>b>c

Serbest ve total T3 ve T4 düzeylerinin çinkodan yetersiz beslenen ve pinealektomi yanı sıra Zn'dan yetersiz beslenen farelerde kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük bulunmuş, TSH dzeylerininse sadece çinkodan yetersiz beslenen grupta anlamlı derecede dştği saptanmıştır (izelge 1.6).

Çizelge 1.6. Kontrol ve deneme gruplarında TSH, serbest ve total T3 ve T4 düzeyleri.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	I. Deneme	II. Deneme	III. Deneme
FT3(pg/mL)	3.74 ± 1.37 ^b	1.22 ± 0.14 ^c	4.45 ± 0.19 ^a	1.94 ± 0.23 ^d
FT4(ng/dL)	2.41 ± 0.36 ^b	0.78 ± 0.10 ^d	3.15 ± 0.26 ^a	1.42 ± 0.18 ^c
TT3(ng/dL)	69.04 ± 14.58 ^a	34.84 ± 1.69 ^b	70.02 ± 2.35 ^a	37.12 ± 1.80 ^b
TT4(µg/dL)	5.43 ± 0.96 ^a	1.97 ± 0.74 ^b	5.65 ± 0.61 ^a	2.13 ± 0.64 ^b
TSH(µIU/mL)	0.37 ± 0.14 ^a	0.05 ± 0.02 ^b	0.48 ± 0.10 ^a	0.30 ± 0.12 ^a

F=Serbest, T=Total, p<0,01. a>b>c>d.

Kratz ve ark (2016) azospermi ve teratozosperti olgulu erkekler ile fertil erkeklerden elde ettikleri sperm içeriklerini melatonin yönünden karşılaştırmış, fertil grubun melatonin düzeyleri ve antioksidan kapasitesi diğer gruplara göre belirgin ölçüde yüksek çıkarken, oksidatif protein ürünleri düşük çıkmıştır. Bu olgu ile melatonin sperm kalitesi üzerindeki etkisinde ortaya konulmuştur.

1.4.8. Melatonin Kemik ve Lipid Metabolizması ile İlişkisi

Onlarca yıl önce pinealektomi yapılan tavukların columna vertebralis bölgesinde gözlemlenen deformasyonlar melatoninin kemik metabolizmasında rolü olabileceği düşüncesini doğurmuştur (Thillard 1959). Suzuki ve Hattori(2002) tarafından yürütülen Tokyo Medikal ve Dental Üniversitesi ile Kanazawa Üniversitelerinin ortak çalışmalarında melatoninin balık iskeleti ve deneysel kemik modellerinde osteoklast aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiş, adı geçen araştırmacıların daha sonraki çalışmalarında da kalsiyumdan yetersiz yemle beslenen ratlara melatonin uygulamalarının kemik mineral yoğunluğunu ve kemik dayanıklılığını artırdığını bulmuşlardır (Suzuki ve ark 2008). Satomura ve ark (2007) ise benzer bulgulara insanlarda ulaşmışlar ve çene kemiği ve iliumun osteoblastlarında melatonin reseptörlerinin varlığını saptamışlar, melatoninin osteoblast proliferasyonunu ve kollojen üretimini arttırdığını ortaya çıkarmışlardır. Melatoninin insanlarda ve deney hayvanlarında uzun süreli kullanımının kan ve karaciğerde LDL düzeylerini düşürdüğü (Hussain 2007), postmenstrual dönemdeki kadınlarda melatonin kullanımının HDL'yi yükselttiği bildirilmiştir (Tamura ve ark 2008).

1.4.9. Melatonin Antioksidan Etkisi

Son yıllarda yürütülen çalışmalarla melatoninin bir yandan serbest radikalleri etkileyerek direkt, diğer yandan da indirekt olarak oksidatif streslerde antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır. Melatonin ve onun prekürsörü olan serotonin yüksek derecedeki lipofilik özellikleriyle serbest radikallerin yok edilmesinde büyük bir önem kazanırken, güçlü bir antioksidan olan vitamin E kan-beyin bariyerini çok az geçebildiğinden kan-beyin bariyerini çok daha kolay geçen melatonin kadar etkili olmadığı ve serbest radikallerin arasında en tehlikelisi olan hidroksil radikalini (OH⁻) yok edebilen antioksidanların en güçlüsünün melatonin olduğu öne sürülmektedir (Ianas ve ark 1991, Hardeland ve Reiter 1993, Reiter 1996). Melatonin hidroksil serbest radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü, bunun da ortamdaki süperoksit radikalini (O₂⁻) tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Deneysel çalışmalarda antioksidanların (OH⁻) radikaline karşı olan etkinliklerinin araştırılması amacıyla, (OH⁻) radikalinin ömrü çok kısa olduğundan (9 saniye), hidroksil grubunun 5,5-dimetilprolin N-oksidi (DMPO) ile reaksiyon ürünü (DMPO-OH) düzeyleri ölçülmektedir. DMPO varlığında ultraviyole ışık (254nm) etkisi ile H₂O 'dan sentezlenen DMPO-OH radikalleri üzerine ortama eklenen melatonin, glutasyon ve mannitolün etkileri araştırılmış ve DMPO-OH radikali oluşumunun %50'sinin baskılanabilmesi için gerekli dozlar melatonin, glutasyon ve mannitol için sırasıyla: 21, 123 ve 283 M/L olarak bulunmuş, melatoninin glutasyona göre 5, mannitole göre ise 15 kat daha güçlü bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Cardinali ve ark 1997).

Serbest radikaller ve hidroksil radikalleri yüksek reaktifliğe sahip olduklarından hücrelerdeki makro molekülleri büyük hasara uğrattırır. Glutasyon ve mannitol gibi iyi bilinen serbest radikal tüketicileri ile melatonin karşılaştırıldığında, melatoninin özellikle DNA gibi makro molekülleri oksidatif hasardan korumada daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Melatonin bütün hücre ve hücre içi komponentlere kolaylıkla diffüze olabildiğinden serbest radikallere daha kolay ulaşır ve serbest radikallerin yok edilmesinde önemli rol oynar. Yüksek toksik güce sahip olan hidroksil radikallerinin yok edilmesi yanı sıra melatonin güçlü bir antioksidan enzim olan ve hidroksil radikalinin prekürsörü olan hidrojen peroksidi (H₂O₂) suya yıkımlayan glutasyon peroksidaz aktivitesini de uyararak ikinci bir yol üzerinden hücreleri oksidatif hasardan korumaktadır (Reiter 1996).

1.4.10. Melatonin ve İmmun Sistem

1.4.10.1. Bağışıklık sistemine etkisi

Fotoperiyodun bağışıklık üzerindeki etkilerinin incelendiği laboratuvar çalışmalarında günlerin kısaldığı mevsimlerde immün sistemin fonksiyonlarının günlerin uzadığı dönemlere göre daha güçlü olduğu, bu olgunun günlerin kısaldığı dönemlerdeki melatonin üretiminin daha fazla olmasından kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (Demas ve ark 1998).

Travma ya da hemorajik şoklardan sonra baskılanan bağışıklık sisteminin melatonin ile düzeltilebildiği (Wichmann ve ark 1996), stres, viral hastalıklar, bakteriyel hastalıklar, kortikosteroid kullanımı ya da ilaç tedavisi sırasında ikincil olarak gelişen immün yetersizliklerin melatonin ile önlenildiği (Maestroni 2001), melatoninin immün sistem hücrelerini ya doğrudan melatonin reseptörleri aracılığıyla ya da dolaylı yoldan steroid hormonlardaki değişikliklere bağlı olarak aktive edebildiği (Hotchkiss ve Nelson 2002) öne sürülmüştür. Esquifino ve ark (2004) da epifizin çıkarılması ya da deneysel olarak melatonin sentezinin engellenmesiyle benzer sonuçları elde etmişler, bağışıklık sisteminde ortaya çıkan baskılanmanın eksojen melatonin uygulamalarıyla giderilebildiğini bildirmişlerdir.

1.4.10.2. Lenfoid dokulara etkisi

Melatonin memeli hayvanların timus, dalak ve immün fonksiyonla doğrudan ilişkili diğer dokuların büyümelerini uyardığı, deneysel olarak epifizleri çıkarılmış ya da ilaçlarla epifizleri inaktive edilmiş memelilerde timus bezinin atrofiye olduğu gözlenmiş, bu hayvanlara dışardan melatonin verilmesinin bezin tekrar hiperplazisini sağladığı tespit edilmiş (Maestroni ve ark 1987), farelerde epifizin çıkarılmasından sonra doğal öldürücü hücre aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (del Gobbo ve ark 1989). Currier ve ark (2000) da farelerin yemlerine melatonin katılmasından sonraki 7. ve 14. günlerde doğal öldürücü hücre ve monosit sayısının arttığını gözlemlemişler, ancak bu durumun tersine kuşlarda melatoninin dalak ve bursa fabrisinin kütlesini azalttığı da saptanmıştır (del Gobbo ve ark 1989).

1.4.11. Melatoninin Termoregülasyon ve Biyolojik Saatteki Rolü

İnsan ve hayvanlarda termoregülasyonda önemli bir role sahip olan melatonin etkisini merkezi vücut ısısını azaltıp, periferik cilt ısısını artırarak gösterdiği, ratlarda düşük doz melatonin uygulamalarının hipertermik, yüksek doz uygulamaların ise hipotermik etkili olduğu saptanmıştır (Macchi ve Bruce 2004).

Vücut ısısının regülasyonu, ısı merkezi olarak bilinen hipotalamusun ön bölümündeki preoptik sahada gerçekleşmektedir. Yapılan araştırmalarda bu merkezdeki nöronlarda melatonin reseptörleri bulunduğu ve melatonin hormonunun bu merkezi etkileyerek vücut ısısında düşmeye neden olduğu bildirilmiştir. (Cagnacci 1996, Tsuzuki ve ark 2004). Fiziksel aktivite sırasında kan melatonin düzeylerinin yükselmesi, egzersizlerden sonra melatonin uygulanan ratlarda plazma laktat düzeylerinin düşerken, kas ve karaciğer glikojen seviyelerinin artması melatonin uygulamasının egzersiz performansını arttırabileceğini düşündürmüştür (Marino 2002), egzersiz sırasında artan miktarlarda salınan melatoninin vücut sıcaklığını tehlikeli düzeylere çıkmasını engelleyerek performansı arttırdığı öne sürülmüştür (Herxheimer ve Petrie 2001).

Özet olarak koyu karanlıkta ve derin uyku periyodunda salınan tüm hücrelerin yenilenmesini, bağışıklık sisteminin güçlenmesini ve vücut direncinin artırılmasını sağlayan melatoninin önemli görevlerinden birisi de biyolojik saatin sürdürülmesi ve ritminin ayarlanmasıdır. Biyolojik saatin regülasyonunu sağlayan başlıca hormon olarak bilinen melatoninin yeterli ve düzenli salgılanmaması sonucu yorgunluk hissi, uykusuzluk, iştahsızlık, hazımsızlık, zihinsel problemler, huzursuzluk, zaman algısında bozulma, olaylara tepki verme zamanının uzaması, yönelim bozukluğu, nedensiz yaygın vücut ağrıları ve bazen terleme gibi bozukluklarla karakterize jetlag'ın geliştiği bildirilmiştir (Herxheimer ve Petrie 2001), melatoninin bir diğer önemli görevinin de uyuma ve uyanmayı sağlayan, bir başka deyişle uyku düzenini kontrol eden bir zamanlayıcı olduğu öne sürülmüştür (Claustrat ve ark 2005).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneklerin Seçimi ve Beslenmesi

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesinde bulunan 2 yaşında 12 kıvırcık ırkı melezi koçların 6 tanesi kontrol 6 tanesi de deneme grubu olacak şekilde gruplandırılmış ve Nisan 2017- Mart 2018 tarihleri arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi çiftliğinde tam açık sistemde farklı bölmelerde barındırılmıştır.

Kontrol ve deneme grubundaki koçlar deneme süresince yaşama payı beslenme gereksinimlerini karşılayacak şekilde dengelenmiş, kaba yem (kuru yonca samanı) ve karma yemden (arpa, tuz ve standart olarak 25 mg/kg/KM ZnO içeren vitamin-mineral karması) oluşan rasyon ile beslenmiştir. Her iki gruptaki koçlara orta kaliteli yonca kuru samanı ad libitum olarak verilirken, pelet halindeki karma yem kontrol grubuna hayvan başına günlük tek öğünde 150 g, deneme grubuna hayvan başına günlük tek öğünde 150 g karma yem + 100 mg/kg/KM ZnO verilmiştir. Yemlere çinkonun homojen bir şekilde karışması amacıyla 10 g ZnO bir kilo yeme eklendikten sonra iyice karıştırılıp, üzerine 9 kg yem eklenmiş tekrar homojen bir karışım sağlandıktan sonra karışım 100 kg'a tamamlanmış (Eklenen ZnO=100mg/kg/KM), homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra deneme grubunun beslenmesinde kullanılmıştır. Deneme ve kontrol grubundaki koçlar 2017 nisan ve 2018 mart ay arasında bir süre ile hazırlanan bu yemlerle beslenmişlerdir.

2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Deneme süresince her ay bir kez (her ayın son haftası perşembe günü saat 11.00' de) koçların vena jugularislerinden alınan kan örnekleri 4000/devir/dakikada 5 dakikasentrifüje edilmiş, kazanılan plazma örnekleri ependorf tüplere alınarak analizlere kadar -20C^o de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.3. Hormon Analizleri

Deneme süresince toplanan örneklerde kisspeptin ve melatonin düzeyleri Konya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Mehmet SERPEK endokrinoloji laboratuvarında ELISA yöntemiyle çalışan kitlelerle belirlenmiştir.

2.3.1. Melatonin Elisa Kiti

Bioassay Tecnologl Laboratory firmasının E0108Sh katalog no.lu 3-700 ng/L ölçüm aralığına sahip, 1,52 ng/L'ye hassas 96 yuvalı hazır enzim assay plakları kullanılmıştır.

2.3.1.1. Analiz prensibi

Koyun melatonin antijeni ile kaplanmış mikrotitre plaklarının kullanıldığı yöntemde, yuvalara standart çözeltileri ve plazma örnekleri eklendikten sonra tracer olarak biotinle işaretlenmiş koyun melatonin antikoru ve HRP (Horse radish peroxydase) birlikte verilerek inkube edilir. İnkubasyon sonrası plaklar yıkanarak tracer'a bağlanmamış HRP'ler uzaklaştırılır, yıkanan plaklara substrat eklenerek inkube edilir ve inkubasyon sona erince stop solusyonu ile enzim reaksiyonu durdurulur, 10 dakika içinde 450 nm absorbanslar okunur.

2.3.1.2. Analiz Protoköü

1. Bütün reaktifler ve hazırlanan çözeltiler oda ısısına getirilir ve analizler oda sıcaklığında sürdürülür.
2. Standart yuvalarına biyotinli antijenle (Tracer) hazırlanmış 50 µl standart çözeltileri eklenir.
3. Analiz yuvalarına 40µl plazma örnekleri 10µl tracer, standartlar ve plazma örneklerinin yuvalarına 50µl streptavidin- HRP eklenir ve 60 dakika 37°C de karanlıkta inkübasyona bırakılır.
4. İnkubasyon tamamlandıktan sonra plak çıkarılır ve plaklar her defasında 350 µl yıkama çözeltisiyle 5'er kez yıkanarak tracer'a bağlanmamış HRP'ler uzaklaştırılır.
5. Mikro titre plağının tüm yuvalarına Substrat A (50µl) ve B (50µl) substrat çözeltisi eklenir, ağzı kapatılan plaklar 37 °C ve karanlıkta 10 dakika inkube edilir.
6. İnkubasyon 50µl stop çözeltisi ilavesiyle durdurulduktan sonra 10 dakika içerisinde plaklar 450 nm'lik dalga boyunda okunur ve bilgisayar programında değerlendirilerek plazma melatonin düzeyleri belirlenir.

2.3.2. Kisspeptin Elisa Kiti

Bioassay Tecnologi Laboratory firmasının E0051Sh katalog no.lu 5-2000 ng/L ölçüm aralığına sahip, 2,37 ng/L'ye hassas 96 yuvalı hazır ELİSA plakları kullanılmıştır.

2.3.2.1. Analiz prensibi

Koyun kisspeptin antijeni ile kaplanmış mikrotitre plaklarının kullanıldığı yöntemde, yuvalara standart çözeltileri ve plazma örnekleri eklendikten sonra tracer olarak biotinle işaretlenmiş koyun kisspeptin antikoru ve HRP (Horse radish peroxydase) birlikte verilerek inkube edilir. İnkubasyon sonrası plaklar yıkanarak tracer'a bağlanmamış HRP'ler uzaklaştırılır, yikanan plaklara substrat eklenerek inkube edilir ve inkubasyon sona erince stop solusyonu ile enzim reaksiyonu durdurulur, 10 dakika içinde 450 nm absorbanslar okunur.

2.3.2.2. Analiz Protoköü

1. Bütün reaktifler ve hazırlanan çözeltiler oda ısısına getirilir ve analizler oda sıcaklığında sürdürülür.
2. Standart yuvalarına biyotinli antijenle (Tracer) hazırlanmış 50µl standart çözeltileri eklenir.
3. Analiz yuvalarına 40µl plazma örnekleri 10µl tracer, standartlar ve plazma örneklerinin yuvalarına 50µl streptavidin- HRP eklenir ve 60 dakika 37°C karanlıkta inkübasyona bırakılır.
4. İnkubasyon tamamlandıktan sonra plak çıkarılır ve plaklar her defasında 350 µl yıkama çözeltisiyle 5'er kez yıkanarak tracer'a bağlanmamış HRP'ler uzaklaştırılır.
5. Mikro titre plağının tüm yuvalarına Subsrat A (50µl) ve B (50µl) substrat çözeltisi eklenir, ağız kapatılan plaklar 37 °C ve karanlıkta 10 dakika inkube edilir.
6. İnkubasyon 50µl stop çözeltisi ilavesiyle durdurulduktan sonra 10 dakika içerisinde plaklar 450 nm'lik dalga boyunda okunur ve bilgisayar programında değerlendirilerek plazma kisspeptin düzeyleri belirlenir.

2.3.3. İstatiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS (versiyon 21) programı kullanılmıştır. Veri setinin normalite testi için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk metotlarından yararlanılmış, değerler genel olarak normal dağılım göstermediğinden istatistiksel farkın hesaplanmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.



3. BULGULAR

3.1. Kisspeptin

Kontrol ve deneme grubunda yer alan koçların aylara göre bireysel plazma kisspeptin düzeyleri Çizelge 3.1 ve 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kontrol grubunda aylara göre bireysel kisspeptin düzeyleri, ng/L

Koç No	A Y L A R											
	2017									2018		
	Nisan	Mayıs	Haz.	Tem.	Ağu.	Eylül	Ekim	Kasım	Ara.	Ocak	Şubat	Mart
1	130,2	292,1	867,8	350,1	396,3	99,3	18,0	18,0	18,0	18,0	49,0	18,0
2	24,4	24,4	18,0	18,0	18,0	34,5	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
3	346,8	1061,9	1002,3	926,1	1215,0	1215,4	1184,6	1037,0	698,7	1199,9	1219,0	1219,0
4	18,0	18,0	18,0	18,0	83,2	41,6	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
5	18,0	18,0	120,7	417,9	255,2	203,1	41,6	18,0	18,0	18,0	18,0	32,1
6	18,0	18,0	112,9	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0

Çizelge 3.2. Deneme grubunda aylara göre bireysel kisspeptin düzeyleri, ng/L

Koç No	A Y L A R											
	2017									2018		
	Nisan	Mayıs	Haz.	Tem.	Ağu.	Eylül	Ekim	Kasım	Ara.	Ocak	Şubat	Mart
1	55,2	127,8	122,3	65,4	111,0	75,1	53,6	18,0	18,0	18,0	18,0	18,0
2	277,9	186,1	796,0	386,1	433,7	366,3	784,9	207,9	117,0	18,0	89,0	66,7
3	278,8	627,7	563,9	489,7	595,7	494,5	678,5	203,9	337,8	231,6	483,7	117,6
4	18,0	65,4	325,0	165,2	129,9	207,9	186,6	18,0	18,0	26,2	89,9	18,0
5	18,0	18,0	58,6	23,3	74,9	18,0	77,5	30,9	35,4	40,0	40,3	18,0
6	610,6	736,2	1219,0	1219,0	1185,0	1219,0	1179,8	811,2	402,7	978,2	1008,9	1219,0

Deneme ve kontrol grubu koçlarının aylara göre plazma kisspeptin düzeylerinin dağılımları Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normalite testleri ile hesaplanmış, sınırlı bazı aylarda normal dağılım görülmesine karşın genel olarak normal bir dağılım görülmediği saptanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Deneme ve kontrol gruplarında kisspeptin düzeylerinin normalite testi

Aylar	Gruplar	Kolmogorov- Smirnov			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	n	p	İstatistik	n	p
Nis.17	Deneme	0,248	6	0,200	0,840	6	0,129
	Kontrol	0,364	6	0,013	0,678	6	0,004
May.17	Deneme	0,303	6	0,090	0,822	6	0,093
	Kontrol	0,363	6	0,013	0,642	6	0,001
Haz.17	Deneme	0,166	6	0,200	0,937	6	0,638
	Kontrol	0,366	6	0,012	0,744	6	0,017
Tem.17	Deneme	0,246	6	0,200	0,834	6	0,116
	Kontrol	0,276	6	0,169	0,814	6	0,078
Ağu.17	Deneme	0,252	6	0,200	0,84	6	0,130
	Kontrol	0,277	6	0,168	0,757	6	0,023
Eyl.17	Deneme	0,246	6	0,200	0,843	6	0,138
	Kontrol	0,389	6	0,005	0,616	6	0,001
Eki.17	Deneme	0,248	6	0,200	0,888	6	0,308
	Kontrol	0,477	6	0,000	0,509	6	0,000
Kas.17	Deneme	0,343	6	0,027	0,717	6	0,009
	Kontrol	0,492	6	0,000	0,496	6	0,000
Ara.17	Deneme	0,256	6	0,200	0,801	6	0,060
	Kontrol	0,492	6	0,000	0,496	6	0,000
Oca.18	Deneme	0,347	6	0,023	0,634	6	0,001
	Kontrol	0,492	6	0,000	0,496	6	0,000
Şub.18	Deneme	0,36	6	0,015	0,752	6	0,021
	Kontrol	0,473	6	0,000	0,512	6	0,000
Mar.18	Deneme	0,436	6	0,001	0,562	6	0,000
	Kontrol	0,483	6	0,000	0,503	6	0,000

$p > 0,05$ normal dağılımı göstermektedir.

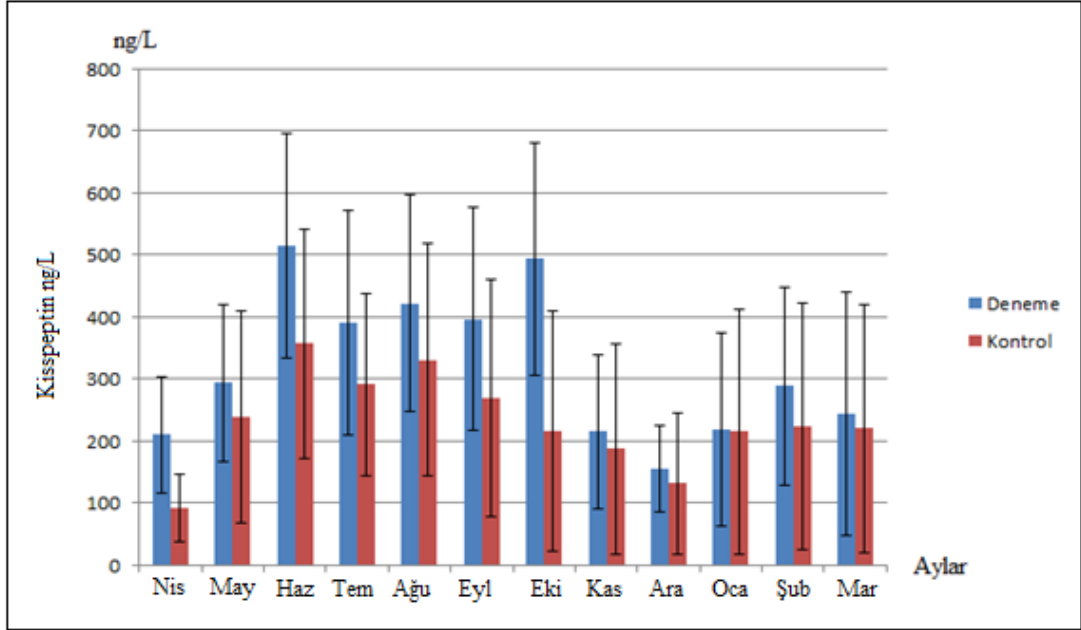
Kontrol ve deneme gruplarında bireysel değerlerin dağılımlarının normal olmaması nedeniyle istatistik hesaplamalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Deneme ve kontrol gruplarında yer alan koçların plazma kisspeptin düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile elde edilen aylara göre istatistiksel hesaplamaları çizelge 3.4 ve şekil 3.1’ de verilmiştir. Çizelge ve şekilden görüleceği gibi plazma kisspeptin düzeylerinin aylık değerlendirilmesinde ZnO eklenmesinden etkilenmediği, deneme ve kontrol grupları arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı anlaşılmaktadır. Ancak hem deneme hem de kontrol gruplarında nisan ayında gözlenen en düşük ortalama değerler mevsimsel olarak istatistiksel açıdan önemli bir değişim göstermiş, haziran ayında en yüksek düzeylerine ulaşan düzeylerin kasım ayına kadar özellikle deneme grubunda kontrol grubuna göre oldukça yüksek seyrettiği belirlenmiş, ancak bireysel değerlerin normal bir dağılım göstermemesi nedeniyle bu farklılıklar istatistik açıdan anlamlı bulunamamıştır. Kasım ayından başlayarak kisspeptin düzeylerinin de melatonin düzeylerine benzer şekilde hızla gerilemeye başladığı gözlenmiştir.

Çizelge 3.4. Deneme ve kontrol gruplarında ortalama kisspeptin düzeyleri, ng/L.

Aylar	Deneme					Kontrol					p	
	n	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$	X_{\min}	X_{\max}	n	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$	X_{\min}	X_{\max}		
2017	Nisan	6	209,8	94,4	18,0	610,6	6	92,6	54,0	18,0	346,8	0,485 ^b
	Mayıs	6	293,5	125,8	18,0	736,2	6	238,7	170,5	18,0	1061,9	0,394 ^b
	Haziran	6	514,2	180,4	58,6	1219,2	6	356,6	184,6	18,0	1002,3	0,394 ^b
	Temmuz	6	391,4	181,4	23,3	1219,0	6	291,4	146,8	18,0	926,1	0,394 ^b
	Ağustos	6	421,6	174,6	74,9	1184,5	6	330,9	187,0	18,0	1215,0	0,485 ^b
	Eylül	6	396,8	179,7	18,0	1219,0	6	268,6	191,4	18,0	1215,4	0,310 ^b
	Ekim	6	493,5	187,2	53,6	1179,8	6	216,4	193,7	18,0	1184,6	0,065 ^b
	Kasım	6	215,0	124,8	18,0	811,2	6	187,8	169,8	18,0	1037,0	0,310 ^b
	Aralık	6	154,8	70,3	18,0	402,7	6	131,4	113,5	18,0	698,7	0,310 ^b
	2018	Ocak	6	218,7	155,6	18,0	978,2	6	215,0	197,0	18,0	1199,8
Şubat		6	288,3	160,3	18,0	1008,9	6	223,3	199,2	18,0	1219,0	0,240 ^b
Mart		6	242,9	195,9	18,0	1219,0	6	220,5	199,7	18,0	1219,0	0,589 ^b

(n: örnek sayısı, \bar{x} : ortalama değer, $S_{\bar{x}}$: ortalama değerin standart hatası, X_{min} : en düşük değer, X_{max} : en yksek değer, p: istatistiki değer.)



şekil 3.1. Deneme ve kontrol gruplarında ortalama kisspeptin dzeyleleri, ng/L

Kontrol ve deneme grubu koçların plazma kisspeptin dzeyleleri arasındaki ilişkiler izelge 3.5 ve 3.6' da verilmiştir. Ancak dzeylelerin mevsimsel değişim göstermesi nedeniyle aylar arasındaki ilişkilerin plazma melatonin dzeylelerinde olduğu gibi büyük bir önem taşımadığı görülebilmektedir. Deneme ve kontrol grubuna ait aylar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlam kazanmaktadır.

Çizelge 3.5. Deneme grubunda aylara göre kisspeptin düzeyleri arasındaki ilişkiler, p değerleri

Aylar	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
Nisan	0,225	0,028	0,028	0,028	0,040	0,050	0,686	0,345	0,750	0,345	0,720
Mayıs		0,173	0,345	0,116	0,230	0,120	0,463	0,046	0,350	0,753	0,350
Haziran			0,028	0,249	0,030	0,460	0,028	0,028	0,030	0,028	0,030
Temmuz				0,116	0,690	0,170	0,046	0,046	0,080	0,043	0,350
Ağustos					0,350	0,350	0,028	0,028	0,030	0,028	0,050
Eylül						0,350	0,046	0,046	0,050	0,375	0,070
Ekim							0,028	0,028	0,030	0,028	0,080
Kasım								0,715	0,500	0,225	0,720
Aralık									0,890	0,138	0,720
Ocak										0,043	0,890
Şubat											0,350

Çizelge 3.6. Kontrol grubunda aylara göre kisspeptin düzeyleri arasındaki ilişkiler, p değerleri

Aylar	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
Nisan	0,180	0,080	0,144	0,080	0,230	0,720	1,000	1,000	1,000	1,000	0,720
Mayıs		0,225	0,715	0,080	0,500	1,000	0,109	0,109	0,590	0,593	1,000
Haziran			0,465	0,893	0,920	0,470	0,144	0,068	0,470	0,465	0,470
Temmuz				0,465	0,890	0,290	0,285	0,109	0,290	0,285	0,290
Ağustos					0,230	0,070	0,068	0,068	0,070	0,144	0,140
Eylül						0,040	0,043	0,043	0,040	0,080	0,080
Ekim							0,100	0,180	0,660	0,285	0,660
Kasım								0,317	0,320	0,180	0,180
Aralık									0,320	0,180	0,180
Ocak										0,180	0,180
Şubat											0,660

3.2. Melatonin

Kontrol ve deneme grubunda yer alan koçların aylara göre bireysel plazma melatonin düzeyleri Çizelge 3.7 ve 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Kontrol grubunda aylara göre bireysel plazma melatonin düzeyleri, ng/L.

Koç No	A Y L A R											
	2017									2018		
	Nisan	Mayıs	Haz.	Tem.	Ağu.	Eylül	Ekim	Kasım	Ara.	Ocak	Şubat	Mart
1	6,0	88,1	132,9	152,1	125,7	40,3	12,7	6,0	6,0	6,0	14,2	7,9
2	16,2	6,0	6,0	14,5	6,0	13,4	6,0	6,0	6,6	6,0	6,0	6,0
3	92,2	343,6	292,5	340,9	369,5	350,4	323,1	309,0	305,9	313,2	369,5	362,3
4	6,0	6,0	6,0	6,0	30,9	22,8	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	7,5
5	6,0	6,0	20,3	108,7	97,3	64,9	26,9	12,4	6,0	6,0	14,9	22,3
6	6,0	6,0	105,3	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Çizelge 3.8. Deneme grubunda aylara göre bireysel plazma melatonin düzeyleri, ng/L.

Koç No	A Y L A R											
	2017									2018		
	Nisan	Mayıs	Haz.	Tem.	Ağu.	Eylül	Ekim	Kasım	Ara.	Ocak	Şubat	Mart
1	12,8	31,7	33,6	12,2	50,9	15,6	13,3	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
2	77,3	51,8	272,7	73,6	129,6	69,0	186,6	22,0	24,2	6,0	6,0	9,9
3	120,6	161,0	178,2	121,7	101,0	122,0	184,0	54,8	107,7	36,4	156,4	47,9
4	6,0	15,1	89,1	37,9	64,8	35,3	27,6	17,0	6,0	6,0	6,0	6,0
5	7,1	9,1	11,6	15,2	33,5	13,9	21,8	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
6	153,2	147,3	401,6	291,0	419,0	341,4	243,3	173,8	139,9	78,2	238,2	390,7

Deneme ve kontrol grubu koçlarının aylara göre plazma melatonin düzeylerinin dağılımları Kolmorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normalite testleri ile

hesaplanmış, sınırlı bazı aylarda normal dağılım görülmesine karşın genel olarak normal bir dağılım görülmediği saptanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Deneme ve kontrol gruplarında melatonin düzeylerinin normalite testi

Aylar	Gruplar	Kolmogrov- Smirnov			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	n	p	İstatistik	n	p
Nis.17	Deneme	0,283	6	0,146	0,850	6	0,158
	Kontrol	0,401	6	0,003	0,567	6	0,000
May.17	Deneme	0,269	6	0,200	0,819	6	0,086
	Kontrol	0,364	6	0,013	0,631	6	0,001
Haz.17	Deneme	0,191	6	0,200	0,928	6	0,567
	Kontrol	0,246	6	0,200	0,834	6	0,116
Tem.17	Deneme	0,236	6	0,200	0,805	6	0,065
	Kontrol	0,255	6	0,200	0,818	6	0,084
Ağu.17	Deneme	0,343	6	0,026	0,716	6	0,009
	Kontrol	0,276	6	0,169	0,781	6	0,040
Eyl.17	Deneme	0,263	6	0,200	0,755	6	0,022
	Kontrol	0,387	6	0,005	0,640	6	0,001
Eki.17	Deneme	0,296	6	0,109	0,816	6	0,082
	Kontrol	0,446	6	0,000	0,545	6	0,000
Kas.17	Deneme	0,314	6	0,065	0,708	6	0,008
	Kontrol	0,476	6	0,000	0,509	6	0,000
Ara.17	Deneme	0,323	6	0,049	0,756	6	0,023
	Kontrol	0,490	6	0,000	0,497	6	0,000
Oca.18	Deneme	0,385	6	0,006	0,689	6	0,005
	Kontrol	0,492	6	0,000	0,496	6	0,000
Şub.18	Deneme	0,400	6	0,003	0,703	6	0,007
	Kontrol	0,478	6	0,000	0,519	6	0,000
Mar.18	Deneme	0,410	6	0,002	0,566	6	0,000
	Kontrol	0,460	6	0,000	0,527	6	0,000

$p > 0,05$ normal dağılımı göstermektedir.

Kontrol ve deneme gruplarında bireysel değerlerin dağılımlarının normal olmaması nedeniyle istatistik hesaplamalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

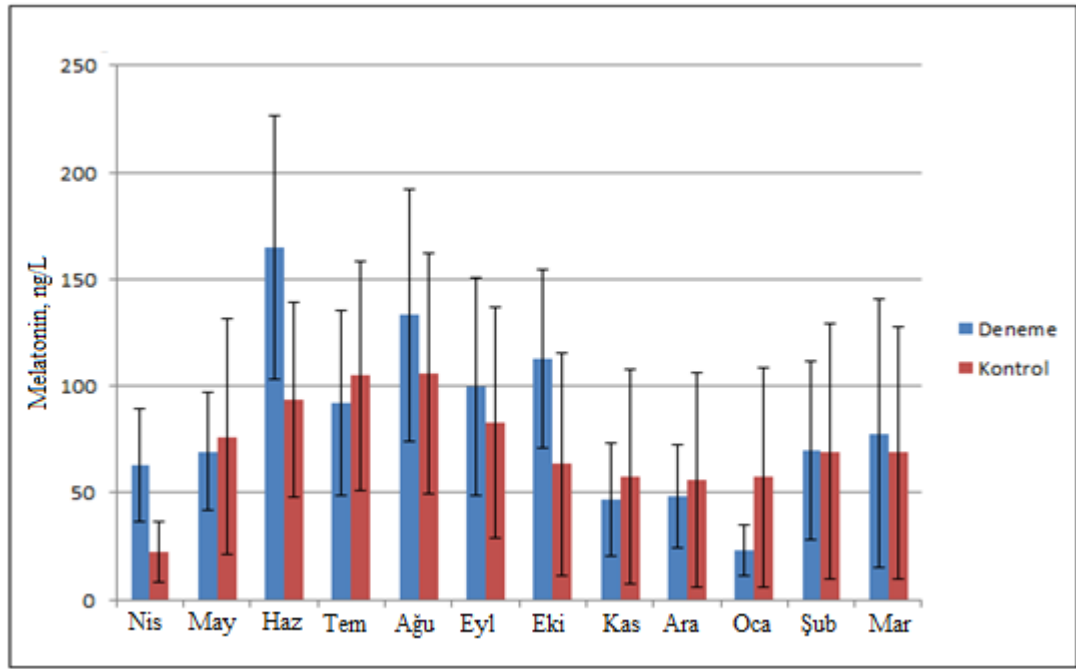
Deneme ve kontrol gruplarında yer alan koçların plazma melatonin düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile elde edilen aylara göre istatistiksel

hesaplamaları çizelge 3.10 ve şekil 3.2’ de verilmiştir. Çizelge ve grafikten görüleceği gibi plazma melatonin düzeylerinin aylık değerlendirilmesinde ZnO eklenmesinden etkilenmediği, deneme ve kontrol grupları arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı anlaşılmaktadır. Ancak hem deneme hem de kontrol gruplarında ocak ayında gözlenen en düşük düzeyler mevsimsel olarak istatistiksel açıdan önemli bir değişim göstermiş, genel olarak şubat ayında başlayan yükselme eğilimi mayıs, haziran aylarında giderek artmış, temmuz–ekim döneminde gözlenen yüksek düzeyler kasım ayından başlayarak tekrar düşmeye başlamıştır.

Çizelge 3.10. Deneme ve kontrol gruplarında ortalama melatonin düzeyleri, ng/L.

Aylar		Deneme					Kontrol					p
		n	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$	X_{\min}	X_{\max}	n	\bar{x}	$S_{\bar{x}}$	X_{\min}	X_{\max}	
2017	Nisan	6	62,8	26,2	6,0	153,2	6	22,1	14,1	6,0	92,2	0,180 ^b
	Mayıs	6	69,3	27,6	9,1	161,0	6	76,0	55,2	6,0	343,6	0,240 ^b
	Haziran	6	164,5	61,7	11,6	401,6	6	93,8	45,5	6,0	292,5	0,394 ^b
	Temmuz	6	92,0	43,2	12,2	291,0	6	104,7	53,4	6,0	340,9	0,818 ^b
	Ağustos	6	133,1	58,9	33,5	419,0	6	105,9	56,4	6,0	369,5	0,394 ^b
	Eylül	6	99,5	51,1	13,9	341,3	6	83,0	54,2	6,0	350,4	0,589 ^b
	Ekim	6	112,8	42,0	13,3	243,3	6	63,4	52,0	6,0	323,1	0,132 ^b
	Kasım	6	46,6	26,5	6,0	173,8	6	57,6	50,3	6,0	309,0	0,394 ^b
	Aralık	6	48,3	24,4	6,0	139,9	6	56,1	50,0	6,0	305,9	0,699 ^b
2018	Ocak	6	23,1	12,1	6,0	78,2	6	57,2	51,2	6,0	313,2	0,818 ^b
	Şubat	6	69,8	41,7	6,0	238,2	6	69,4	60,0	6,0	369,5	0,818 ^b
	Mart	6	77,7	62,9	6,0	390,7	6	68,7	58,8	6,0	362,3	1,000 ^b

(n: örnek sayısı, \bar{x} : ortalama değer, $S_{\bar{x}}$: ortalama değerın standart hatası, X_{\min} : en düşük değer, X_{\max} : en yüksek değer, p: istatistiki değer.)



Şekil 3.2. Deneme ve kontrol gruplarında ortalama melatonin düzeyleri, ng/L.

Kontrol ve deneme grubu koçların plazma melatonin düzeyleri arasındaki ilişkiler çizelge 3.11 ve 3.12’ de verilmiştir. Ancak düzeylerin mevsimsel değişim göstermesi nedeniyle aylar arasındaki ilişkilerin büyük bir önem taşımadığı görülebilmektedir. Deneme ve kontrol grubuna ait aylar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlam kazanmaktadır.

Çizelge 3.11. Kontrol grubunda aylara göre melatonin düzeyleri arasındaki ilişkiler, p değerleri

Aylar	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
Nisan	0,285	0,080	0,144	0,080	0,080	0,273	0,593	0,655	0,055	0,465	0,225
Mayıs		0,465	0,144	0,068	0,345	0,593	0,285	0,285	0,180	1,000	0,715
Haziran			0,500	0,686	0,917	0,465	0,273	0,225	0,273	0,273	0,686
Temmuz				0,893	0,500	0,068	0,068	0,068	0,068	0,273	0,345
Ağustos					0,080	0,068	0,068	0,080	0,068	0,109	0,068
Eylül						0,043	0,043	0,043	0,043	0,225	0,138
Ekim							0,109	0,144	0,109	0,593	1,000
Kasım								0,285	0,655	0,109	0,068
Aralık									0,655	0,144	0,080
Ocak										0,109	0,068
Şubat											1,000

Çizelge 3.12. Deneme grubunda aylara göre melatoninin düzeyleri arasındaki ilişkiler, p değerleri

Aylar	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart
Nisan	0,463	0,028	0,173	0,046	0,173	0,028	0,463	0,043	0,043	0,893	0,500
Mayıs		0,028	0,463	0,173	0,463	0,116	0,249	0,028	0,028	0,345	0,345
Haziran			0,046	0,345	0,046	0,116	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
Temmuz				0,075	0,917	0,463	0,028	0,028	0,028	0,173	0,345
Ağustos					0,075	0,753	0,028	0,046	0,028	0,116	0,028
Eylül						0,600	0,028	0,028	0,028	0,173	0,173
Ekim							0,028	0,028	0,028	0,028	0,249
Kasım								1,000	0,068	0,465	0,715
Aralık									0,109	0,285	1,000
Ocak										0,180	0,109
Şubat											0,593

4. TARTIŞMA

Kaynak taramalarında doğrudan koyunlarda ya da koçlarda çinkonun kisspeptin ve melatonin düzeylerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanamamıştır. Ancak özellikle kemirgenlerde çinkonun etkileri konusunda yürütülen çalışmalarda çinkonun iştahın kontrolünde rol oynadığının, kemirgenler yanı sıra insanlarda da çinko yetersizliğinin iştah kapanmasına yol açtığı ve Zn takviyelerinin tekrar iştahı arttırdığının ortaya konması (Prasad 1991, McClain ve ark 1993), çinko yetersizliği bulunan bireylere uygulanan çinko takviyeleri ile vücut yağ kütlesi sabit kalır ya da azalırken, vücut kas kütlesinde artışların gözlenmesi (Prasad 1991, Ninh ve ark 1996) çinkonun iştah ve vücut kütlesi üzerine olan bu etkisini hipotalamusa bağlı nucleus arcuatus bölgesinde etkili leptin ile birlikte gösterdiğini akla getirmiş (Mangian ve ark 1997), obezite çalışmalarında plazma Zn düzeylerindeki düşmeleri leptin düzeylerindeki düşmelerin izlemesi ve invitro ortamda kadınların adipoz doku hücre kültürlerine 0.2 mmol/L çinko ilavesiyle leptin düzeylerinde sağlanan % 142 oranındaki artışla bu düşünce doğrulanmıştır (Chen ve ark 2000)

Daha sonraları aynı düşünceden hareketle Zn'nun melatonin düzeylerini de etkileyebileceği düşünülmüş, Baltacı ve ark (2003) farelerde çinkodan yetersiz beslenmenin ve pinealektominin çinko ve melatonin düzeylerine etkilerini araştırmışlar, yeterli miktarda çinko alan kontrol grubunda 121.30 ± 9.94 µg/dl olarak belirlenen plazma Zn ve 18.78 ± 8 pg/ml bulunan plazma melatonin düzeylerinin Zn'dan yetersiz beslenen grupta sırasıyla 74.55 ± 7.19 µg/dl ve 10.36 ± 3.57 pg/ml'ye düştüğünü gözlemişler (Çizelge 1.5) ve bu düşmelerin istatistik açıdan önemli bulunmasını çinkonun melatonin konsantrasyonlarını etkilemesinin kanıtı olarak değerlendirmişlerdir.

Song ve Chen (2009) de erkek farelerde melatoninin leptin, glikoz, insülin, çinko ve vücut yağ kitle indeksine etkisini araştırmışlar, içme suları ile 21.00- 07.00 saatleri arasında günlük 35µg melatonin verilmesinin glikoz ve insülin düzeylerini düşürürken, leptin ve çinko düzeylerini artırdığını saptamışlar ve melatonin, leptin ve çinko arasında etkileşimin bulunduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmada yukarıda verilen bilgilerden hareketle düşünülmüş, koçların yemlerine uzun süreli Zn ilavesinin plazma melatonin ve kisspeptin düzeylerine etkisi araştırılmıştır.

Casao ve ark (2013) kulaklarına deri altı olarak 18 mg melatonin uygulanan koçlarda çiftleşme sezonu dışında melatonin uygulamalarının bazı seminal plazma hormon düzeylerine etkisini araştırmak amacıyla 22 hafta boyunca kan örnekleri toplamışlar, implant uygulamasından önce 60.94 pg/ml olarak kaydedilen plazma melatonin düzeylerinin uygulamayı izleyen 1. Günde 229.45 pg/ml'ye yükseldiğini, giderek artan düzeylerin 8-9. haftalarda en yüksek düzeylere eriştikten sonra gerilemeye başladığını ve 17. haftada kontrol grubu düzeylerine düştüğünü bildirmişlerdir.

Egerszegi ve ark (2014) 0 ve 30. günlerde iki kez kulağa 18 mg deri altı melatonin implantının 60 günlük periyotdabazı sperm parametrelerine ve hormonlara etkisini araştırmışlar, implant yerleştirilmeden önce 92.4±9.15 pmol/L olan plazma melatonin düzeylerinin 30. ve 60. günlerde istatistik açıdan önemli derecede yükselerek sırasıyla 445.3±91.55 pmol/L, 699.45±163.91 pmol/L'ye ulaştığını bulmuşlardır.

Çalışmada kontrol grubu koçlarda melatonin düzeyleri bir yıl boyunca aylara göre istatistik açıdan önemli değişimler göstermiş, en yüksek düzeyler haziran, temmuz ve ağustos aylarında sırasıyla 93.8±45.5, 104.7±53.4, ve 15.9±56.4 ng/L, en düşük düzeyse nisan ayında bulunurken (22.1±14,1 ng/L), diğer aylarda değerler 83.0±54.2 – 56.1±50.0 ng/L arasında değişmiş (Çizelge 3.10, grafik 2), bu düzeylerin hangi aylarda ölçüldüğü bilinmemesine karşın Casao ve ark (2013) ve Egerszegi ve ark (2014)'ın değerlerinin ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Bir yıl boyunca 125mg/kg/KM ZnO içeren yemden günlük 150 g verilen deneme grubunda plazma melatonin düzeylerinin aylara göre kontrol gruplarında olduğu gibi önemli değişimler gösterdiği, ancak haziran ayında ölçülen en yüksek düzeyin (164.5±61.7 ng/L) kontrol grubunun aksine ekim ayına kadar yüksekliğini koruduğu, en düşük değer ocak ayında (23.1±12.1 ng/L) bulunduğu gözlenmiş, diğer aylarda değerlerin (46.6±26.5-77.7±62.9 ng/L) arasında salındığı saptanmıştır (Çizelge 3.10).

Deneme ve kontrol gruplarının aylara göre plazma melatonin düzeyleri arasında bazı aylarda (nisan, haziran ve ekim) büyük farklılıklar gözlenmesine karşın, Kolmogrov-Smirnov ve Shapiro-Wilk metotlarına göre yapılan normalite testlerinden de görülebileceği gibi ($p<0,05$, çizelge 3.9), bazı aylar hariç genel olarak bireysel değerlerin büyük değişkenlikler göstermesiyle (çizelge 3.7 ve 3.8), ortalama değerlerin standart hatalarının yüksek çıkması sonucu bu farklılıklar Baltacı ve

ark(2003) farelerde, Song ve Chen (2009)'nin erkek farelerde melatonin ve Zn arasında önemli bir ilişki bulunduğuna ilişkin tespitlerinin tersine istatistik açıdan önemli bulunamamıştır (çizelge 3.10 ve şekil 3.2).

Hayvanlarda üremenin melatonin kontrolünde gün uzunluğuna bağlı olduğu, kısa gün periyodunda salındıktan sonra GnRH üzerinden LH ve FSH'nin salınımını stimüle ederek reproduksiyonu başlattığı, uzun gün periyodunda ise GnRH'yı inhibe edici etki göstererek reproduksiyonu durdurduğu bildirilmiş, ancak melatonin ve GnRH arasındaki bu etkileşimin nasıl oluştuğu tam olarak açıklanamamıştır (Buchanan ve Yellon 1991, Viguie ve ark 1995, Goodman ve ark 2010). Son yıllarda keşfedilen kisspeptinin, melatoninden gelen sinyalleri GnRH nöronlarına ileterek GnRH stimülasyonunda rol oynadığı öne sürülmesinden sonra (Irwig ve ark 2004, Ancel ve ark 2012), Revel ve ark (2006) fotoperiyoda bağlı olarak melatoninin Kiss1-R sinyallerini modüle ederek reproduktif aksı harekete geçirdiğini, Carvenalli ve ark (2011) zebra balıklarında melatoninin kisspeptin ve GnRH reseptörlerini indüklediğini, Alvarado ve ark (2015) erkek deniz levreklerinde eksojen melatonin uygulamalarından 30 gün sonra hipotalamustaki Kiss1-R ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığını tespit etmişlerdir. Aynı doğrultuda koyunlarda yürütülen çalışmalarda da uzun gün periyodunda arkuat çekirdekdeki Kiss1 ekspresyonunun belirgin ölçüde düşük olduğu (Clarke ve ark 2009b), kısa gün periyodunda arkuat çekirdekdeki Kiss1-mRNA ekspresyonlarının uzun gün periyoduna göre oldukça yüksek düzeylerde seyrettiğinin belirlenmesi (Wagner ve ark 2008), koyunlarda da kisspeptinin hipotalamusun bazal preamammillar nükleusunda bulunan melatonin sinyallerinin GnRH sekresyonunu başlatılmasında rol oynayabileceğini düşündürmüş (Clarke ve ark 2009a), beynin ARC bölgesinde ER α ekspresyonu yapan nöronların A15 nükleusu ile etkileşim içerisinde kisspeptin hücrelerinin östradiol sinyallerini dopaminerjik nöronlara ilettiği, birlikte mevsimsel üremede önemli görevler aldıkları ve A15 nöronlarının kisspeptin nöronlarını inhibe ederek GnRH salınım sıklığını baskıladığı saptanmıştır (Clarke ve ark 2009a, Goodman ve ark 2010).

Çinko ile kisspeptin arasında doğrudan ya da dolaylı her hangi bir ilişkinin varlığını ortaya koyabilecek kaynağa rastlanmamıştır. Ancak bir yandan farelerde melatonin ile Zn arasında anlamlı bir ilişkinin varlığına işaret eden bulgular (Baltacı ve ark 2003, Song ve Chen 2009) bir yandan da melatoninin GnRH üzerindeki

etkisine kisspeptinin aracılık ettiği konusundaki veriler (Irwig ve ark 2004, Revel ve ark 2006, Wagner ve ark 2008, Clarke ve ark 2009a, Goodman ve ark 2010, Ancel ve ark 2012) kisspeptin ile Zn arasında bir ilişkinin varlığını düşündürmüştür. Bu düşünce insanlarda ve kemirgenlerde çinko yetersizliğinin iştahı azaltması, (Prasad 1991, McClain ve ark 1993), zayıf ve çinko yetersizliği bulunan bireylere uygulanan çinko ilavelerinin yağsız vücut kütlelerini artırırken, yağlı vücut kütlelerinin stabil kalması ya da azalması (Prasad 1991, Ninh ve ark 1996), çinkonun iştah ve vücut kütleleri üzerindeki etkisinin hipotalamusa bağlı nucleus arcuatus bölgesinde etkili leptin ile birlikte göstermesi (Mangian ve ark 1997), plazma Zn düzeylerindeki düşmeleri, leptin düzeylerinin azalmasının izlenmesi ve invitro ortamda kadınların adipoz doku hücre kültürlerine 0.2 mmol/L çinko ilavesinin leptin düzeylerinde % 142 oranında bir artış sağlanması (Chen ve ark 2000), leptin verilmesinden sonra arkuat çekirdekdeki nöronların yaklaşık yarısında Kiss1-mRNA ve leptin reseptörü (Ob-R) ekspresyonunun birlikte artması (Smith ve ark 2006a), kisspeptin-10 verilen tavşanlarda kan çinko bakır kobalt ve manganez düzeylerinde görülen artışların kisspeptin antagonisti peptid 234 tarafından durdurulması (Quershi ve Abbas (2013) gibi bulgularla desteklenmiştir.

Çalışmada bu bilgiler ışığında koçlarda çinkonun kisspeptin düzeylerine etkileri bir yıl boyunca incelenmiş, kontrol grubu koçların plazma kisspeptin düzeylerinin aylara göre önemli farklılıklar gösterdiği, nisan ayında melatonin düzeylerinde olduğu gibi düşük olan plazma düzeylerin (92.6 ± 54.0 ng/L), mayıs ayında yükseldiği (238.7 ± 170.5 ng/L) eylül ayına kadar süren bu düzeylerin ekim ayından sonra bir miktar gerilediği ve hafif salınımlarla düzeylerin korunduğu gözlenmiş, bulguların melatonin ve kisspeptin arasındaki ilişkileri destekler nitelikte olduğu düşünülmüştür (Çizelge 3.4, grafik1) .

Her gün 125 mg/kg/KM ZnO içeren yemden 150 g verilen deneme grubunun kisspeptin düzeylerinin aylık değişimlerinin, deneme grubu melatonin düzeylerine benzer bir seyir izlediği, nisan ayında 209.8 ± 94.4 ng/L olan düzeylerin mayıs ayında yükselmeye başladığı (293.5 ± 125.8 ng/L), haziran ayında pik yapan düzeylerin (514.2 ± 180.4 ng/L) hafif salınımlarla ekim ayına kadar sürdüğü kasım ayından sonra gerilemeye başlayan düzeylerin 154.8 ± 70.3 - 288.3 ± 160.3 ng/L arasında seyrettiği saptanmıştır. Deneme grubunda elde edilen aylık değerlerin kontrol gruplarına göre özellikle yaz ve güz aylarında oldukça yüksek olduğu gözlenmiş (Çizelge 3.4, şekil 3.1), fakat bu farklılıklar bireysel değerlerin çok farklı olmasına (çizelge 3.1 ve 3.2)

bağlı olarak ortalama değerlerin standart hatalarının yüksek çıkması (izelge 3.4) ve Kolmogrov-Smirnov ve Shapiro-Wilk metotlarına göre yapılan normalite testlerine göre ($p < 0,05$, izelge 3.3) dağılımın bozuk olması sonucu istatistik açıdan anlamlı bulunmamıştır (izelge 3.4 ve şekil 3.1).

Bir yandan farelerde melatonin ile Zn arasında anlamlı bir ilişkinin varlığına işaret eden bulgular (Baltacı ve ark 2003, Song ve Chen 2009) bir yandan da melatoninin GnRH zerindeki etkisine kisspeptinin aracılık ettiği konusundaki veriler (Irwig ve ark 2004, Revel ve ark 2006, Wagner ve ark 2008, Clarke ve ark 2009a, Goodman ve ark 2010, Ancel ve ark 2012), kisspeptin-10 verilen tavşanlarda kan çinko, bakır, kobalt ve manganez düzeylerinde görülen artışların kisspeptin antagonisti peptid 234 tarafından durdurulması (Quershi ve Abbas 2013) gibi bilgiler koçlarda da Zn ile kisspeptin arasında ilişkinin bulunabileceğini desteklemektedir. Ancak ilişkinin kesin olarak ortaya konulabilmesi için çok daha fazla örnek sayısı ile çalışmanın zorunlu olduğu da görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak koçlarda plazma melatonin ve kisspeptin düzeylerinin oldukça benzer bir şekilde mevsimsel bir değişim gösterdikleri, yaz aylarında ve üreme dönemlerinde yüksek seyreden düzeylerin diğer dönemlerde gerilediği, hem melatonin hem de kisspeptin düzeylerinin özellikle düzeylerin yüksek seyrettiği aylarda olmak üzere Zn ilaveleri ile arttığı, ancak bireysel değerlerin dağılımlarının değişkenliği ve örnek sayılarının az olmasının bu farklılıkların istatistik açıdan önemsiz olmasına yol açtığı gözlenmiştir. Kisspeptin ve melatonin arasında ya da Zn ile melatonin arasındaki ilişkilerin incelendiği bir çalışmaya rastlanmayan koçlarda bu çalışma bir yol gösterici olarak değerlendirilmiştir.

Çinko ile melatonin ve kisspeptin ya da melatonin ve kisspeptin arasındaki bu ilişkilerin tam olarak ortaya konulabilmesi amacıyla hem koçlarda hem de koyunlarda daha fazla örnek sayıları ile çalışmaların sürdürülmesinin gerekli olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abecia JA, Forcada F, Palacín I, Sánchez-Prieto L, Sosa C, Fernández-Foren A, Meikle A, 2015. Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Cambridge University Press* 23(1), 116-24.
- Agricultural Research Council (ARC) 1980. The nutrient requirements of ruminant livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, 4th ed. Slough, UK, p, 256-262
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS, 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-52.
- Allen JG, Masters HG, Peet RL, Mullins KR, Lewis RD, Skirraws SZ, Fry J, 1983. Zinc toxicity in ruminants. *J Comp Pathol*, 93, 363-77.
- Alvarado MV, Carrillo M, Felip A, 2015. Melatonin-induced changes in kiss/gnrh gene expression patterns in the brain of male sea bass during spermatogenesis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 185, 69-79.
- Ancel C, Bentsen AH, Sébert ME, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V, 2012. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: The exception proves the rule. *Endocrinology*, 153, 1352-63.
- Backholer K, Smith JT, Rao A, Pereira A, Iqbal J, Ogawa S, Li Q, Clarke IJ, 2010. Kisspeptin cells in the ewe brain to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, 151, 2233-43.
- Baltacı AK, Moğulkoç R, Bediz CS, Kul A, Ugur A, 2003. Pinealectomy and zinc deficiency have opposite effects on thyroid hormones in rats. *Endocr Res*, 29(4), 473-81.
- Barb CR, Kraeling RR, 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci*, 83, 155-67.
- Beck O, Jonsson G, 1981. In vivo formation of 5-methoxytryptamine from melatonin in rat. *J Neurochem*, 36, 2013-18.
- Beyer CE, Steketee JD, Saphier D, 1998. Antioxidant properties of melatonin an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*. 56, 1265-72.
- Blache D, Adam CL, Martin GB. 2002. The mature male sheep: a model to study the effects of nutrition on the reproductive axis. *Reprod Suppl*, 61, 219-33.
- Blache D, Zhang S, Martin GB, 2003. Fertility in male sheep: modulators of the acute effects of nutrition on the reproductive axis of male sheep. *Reprod Suppl*, 61, 387-402.
- Bradley, RL, Cheatham B, 1999. Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes*, 48(2), 272-78.
- Bray GA, 1991. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the mona lisa hypothesis. *J Nutr*, 121, 1146-62.
- Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I, 1996. Effects of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 81(9), 3419-23.
- Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni GJ, Phang SF, Reiter RJ, 1998. Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol Signals recept*, 7, 4195-219.
- Buchanan KL, Yellon SM, 1991. Delayed puberty in the male djungarian hamster: Effect of short photoperiod or melatonin treatment on the GnRH neuronal system. *Neuroendocrinology*, 54, 96-102.

- Cagnacci A, 1996. Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res*, 21, 200-13.
- Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P, 1995. Recombinant mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269(5223), 546-49.
- Caraty A, Smith JT, Lomet D, Ben Saïd S, Morrissey A, Cognie J, Doughton B, Baril G, Briant C, Clarke IJ, 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148(11), 5258-67.
- Cardinali DP, Glombek DA, Resenstein RE, Cutrera RA, Esquifino AI, 1997. Melatonin site and mechanisms of action: Single or multiple. *J Pineal Res*, 23, 32-39.
- Carnevali O, Gioacchini G, Maradonna F, Olivotto I, Migliarini B, 2011. Melatonin induces follicle maturation in *Danio rerio*. *Plos one* 6, e19978.
- Casao A, Perez-Pe R, Abecia JA, Forcada F, Muino Blanco T, Cebiran-Perez JA, 2013. The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of rasa aragonesa rams. *Animal Reproduction Science*, 138, 168-74.
- Castracane VD, Henson, MC, 2007. The obese (ob/ob) mouse and the discovery of leptin. *Mineralogical Society Series*, 25, 1-9.
- Chalivoix S, Bagnolini A, Caraty A, Cognie J, Malpoux B, Dufourny L, 2010. Effect photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol*, 22, 110-18.
- Chen MD, Song YM, Lin PY, 2000. Zinc may be a mediator of leptin production in humans. *Life Sci*, 66(22), 2143-49.
- Clarke IJ, Qi Y, Puspita I, Smith JT, 2009a. Evidence that RF-amid related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol*, 30(3), 371-78.
- Clarke IJ, Smith JT, Caraty A, Goodman RL, Lehman MN, 2009b. Kisspeptin and seasonality in sheep. *Peptides*, 30, 154-63.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G, 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev*, 9(1), 11-24.
- Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J Jr, Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazão R, Lee CE, Gautron L, Zigman JM, Elias CF. 2011. Characterization of kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience*, 26(173), 37-56.
- Cravo RM, Frazao R, Perello M, Osborne-Lawrence S, Williams KW, Zigman JM, Vianna C, Elias CF, 2013. Leptin signaling in kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS One*.8(3):e58698.
- Currier NL, Sun LZ, Miller SC, 2000. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non specific immunity. *J Neuroimmunol*, 104, 101-08.
- Davies NT, Soliman, HS, Corrigan W, Flett A, 1977. The susceptibility of suckling lambs to zinc toxicity. *Brit J Nutr*, 38, 153-56.
- De Bond JA, Li Q, Millar RP, Clarke IJ, Smith JT, 2013. Kisspeptin signaling is required for the uterine hormone response in anestrous ewes following the introduction of males. *PLoS One* 8 e57972.

- Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PA, Martin GB, 2009. The male effect in sheep and goats revisiting the dogmas. *Behav Brain Res*, 200, 304-14.
- del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calìò R, Nisticò G, 1989. Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol*, 11(5), 567-73.
- Demas GE, Nelson RJ, 1998. Exogenous melatonin enhances cell mediated but not humoral immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Biol Rhythms*, 13, 245-52.
- Dhilló WS, Chaudhri OB, Thompson EL, Murphy KG, Patterson M, Ramachandran R, Nijher GK, Amber V, Kokkinos A, Donaldson M, Ghatei MA, Bloom SR, 2007. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 3958-66.
- Dhilló WS, 2008. Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function. *J Neuroendocrinol*, 20, 963-70.
- Domanski E, Przekop F, Polkowska J. 1980. Hypotalamic centres involved in the control of gonadotrophin secretion. *J Reprod Fertil*. 58 (2), 493-99.
- Donato Jr J , Cravo RM, Frazão R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, Richardson JA, Friedman J, Chua S Jr, Coppari R, Zigman JM, Elmquist JK, Elias CF, 2011. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in kiss1 neurons. *J Clin Invest*, 121(1), 355-68.
- Egerszegi I, Sarlos P, Ratky J, Solti L, Faigl V, Kulcsar M, Cseh S, 2014. Effect of melatonin treatment on semen parameters and endocrine function in black racka rams out of the breeding season. *Small Ruminant Research*, 116, 192-98.
- Esquifino A, Pandi-Perumal S, Cardinali DP, 2004. Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(6), 423-33.
- Foradori CD, Amstalden M, Goodman RL, Lehman MN, 2006. Colocalisation of dynorphin a and neurokinin B immunoreactivity in the arcuate nucleus and median eminence of the sheep. *J Neuroendocrinol*, 18, 534-41.
- Farooqi I, Jebb S, Langmack G, Lawrence E, Cheetham C, Prentice A, Hughes I, McCamish M, O'Rahilly S, 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*, 341, 879-84.
- Friedman JM, Halaas, JL, 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-70.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC, 1998. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science*, 279, 1358-60.
- Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P. and Clarke IJ, 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, 148, 5752-60.
- Goodman RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolen LM, Lehman MN, 2010. Neural systems mediating seasonal breeding in the Ewe. *J Neuroendocrinol*, 22, 674- 81.
- Goodman RL, Maltby MJ, Millar RP, Hileman SM, Nestor CC, Whited B, Tseng AS, Coolen LM. Lehman MN, 2012. Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold gnRH pulse frequency in check in anestrous ewes, *Endocrinology*. 153, 5918-27.
- Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE, 2000. Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology*. 141, 4218-25.

- Haenlein, GFW, Anke M, 2011. Mineral and traceelement research in goats- A Review. *Small Ruminant Research*, 95, 2-19.
- Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM, 1997. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci*, 94, 8878-83.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE, 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci*. 25(49), 11349-56
- Han Y, Liu G, Jiang X, Ijaz N, Tesema B, Xie G, 2015. Kiss1 can be used as a novel target for developing a DNA immunocastration vaccine in ram lambs. *Vaccine* 33(6), 777-82.
- Hardeland R, Reiter RJ, 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin. *Neurosci Biobehav Rev*, 17, 347-56.
- Hardeland R, 2009a. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 35, 183-92.
- Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ, 2009b. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res*, 47, 109-26.
- Hardeland R, 2010. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr. Neuropharmacol*. 8, 168-81.
- Hashizume T, Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Ezzat AA, Sawai K, Yamashita T, 2010. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim Reprod Sci*, 118(1), 37-41.
- Hassan AA, El Ashry GM, Soliman SM, 2011. Effect of supplementation of chelated zinc on milk production in ewes. *Food and Nutrition Sciences*. 2, 706-13.
- Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ, 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int*, 35, 627-34
- Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL, 1991. Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biol Reprod*, 44, 476-82.
- Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL 1994. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrous ewes. *Endocrinology*. 134, 1905-14.
- Hawken PA, Jorre TJ, Rodger J, Esmaili T, Blache D, Martin GB, 2009. Rapid induction of cell proliferation in the adult female ungulate brain (*Ovis aries*) associated with activation of the reproductive axis by exposure to unfamiliar males. *Biol Reprod*, 80, 1146-51.
- Henry BA, Goding JW, Alexander WS, Tilbrook AJ, Canny BJ, Dunshea F, Rao A, Mansell A, Clarke IJ, 1999. Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. *Endocrinology*, 140, 1175-82.
- Henry BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea F, Clarke IJ, 2001. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. *J Endocrinol*, 168, 67-77.

- Herxheimer A, Petrie KJ, 2002. Melatonin for preventing and treating jet lag. Cochrane Database Syst Rev. (2), CD001520. Doi: 10.1002/14651858.CD001520
- Hotchkiss AK, Nelson RJ, 2002. Melatonin and immune function: Hype or hypothesis? Crit Rev Immunol, 22, 351-71.
- Hussain SA, 2007 Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. J Pineal Res, 42, 267-71.
- Ian Darnton-Hill, 2013. Zinc supplementation during pregnancy. e-Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA). Erişim tarihi, 10 Mayıs 2019 Erişim Adresi, http://www.who.int/elena/bbc/zinc_pregnancy/en/.
- Ianas O, Olivescu R, Badescu I, 1991. Melatonin involvement in oxidative processes. Rom J Endocrinol, 29,117-23.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA, 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of Kiss1 mRNA in the male rat. Neuroendocrinol, 80,264-72.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR, 1996. Kiss1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressorgene. J Natl Cancer Inst, 88, 1731-37.
- Kadokawa H, Matsui M, Hayashi K, Matsunaga N, Kawashima C, Shimizu T, Kida K, Miyamoto A, 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of growth hormone as well as luteinizing hormone in prepubertal Holstein heifers. J Endocrinol, 196, 331-34.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlioğlu M, Başpınar N, Tiftik AM, 2006. Biyokimya. Nobel yayın Dağıtım, 3. Baskı Ankara, s, 43-44
- Keen KL, Wegner FH, Bloom SR, Ghatei MA, Terasawa E, 2008. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. Endocrinology, 149,4151-57.
- Kessler J, Morel I, Dufey PA, Gutzwiller A, Stern A, Geyer H, 2003. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass meat and claw quality in fattening bulls. Livestock Production Science, 81(2), 161-71.
- Kinsey-Jones JS, Li XF, Luckman SM, O'Byrne KT, 2008. Effects of kisspeptin-10 on the electrophysiological manifestation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female rat. Endocrinology, 149, 1004-08.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R, 1997. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. Recent Prog Horm Res, 52, 307-57.
- Klein DC, 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: the Timezyme. J Biol Chem, 282, 4233-37.
- Kniazewski B, Sobieraj H, Zwirska-Korcza K, Buntner B, Ostrowska Z, 1990 Influence of melatonin on thyroid secretion in pinealectomized rats. Endocrinol Exp. 24(3), 317-24.
- Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brezillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandepuut F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M, 2001. The metastasis suppressor gene Kiss1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. J Biol Chem, 276 (37), 34631-36.

- Kozat S, Mert H, Yüksek N, Mert N, Ekin S, 2007. Serum levels of some trace elements and thyroid hormones in yearling rams with retardation in growth. *Bull Vet Inst Pulawy*, 51, 117-20.
- Kratz E M, Piwowar A, Zeman M, Stebelova K, Thalhammer T, 2016. Decreased, melatonin levels and increased levelsof advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. *Reprod Fertil Dev*, 28(4), 507-15.
- Kundu MS, De AK, Jeyakumar S, Sunder J, Kundu A and Sujatha T. 2014. Effect of zinc supplementation on reproductive performance of Teressa goat. *Veterinary World*, 7(6), 380-83.
- Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen AT, George SR, O'Dowd BF, 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*, 446, 103-07.
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR, 1996. Kiss1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 88, 1731-37.
- Leblondel G, Allain P, Bouil AL, 1992. Influence of thyroparathyroidectomy and thyroxine replacement on Cu and Zn cellular distribution and on the metallothionein level and induction in rats. *Biol Trace Elem Res*, 32(1-3), 281-88.
- Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL, 2010. Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 151, 3479-89.
- Lerner AB, Case JD. 1959 Pigment cell regulatory factors J. *Invest Dermatol*, 32, 211.
- Leston J, Harthé C, Brun J, Mottolose C, Mertens P, Sindou M, Claustrat B, 2009. Melatonin is release in the third ventricle in humans. A study in movement disorders. *Neurosci. Lett*. 469, 294-97.
- Lincoln GA, Maeda KI, 1992. Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *Journal of Endocrinology*, 132, 201-15.
- Lincoln GA, 1994. Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, paraventricular and the lateral septum of the forebrain on the secretion of follicle-stimulating hormone and prolactin and testicular size in rams. *Journal of Endocrinology*, 142, 267-76.
- Lord G, 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation induced immunosuppression. *Nature*, 394, 897-901.
- Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ, 2005. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug. Metab. Dispos*. 33, 489-94.
- Macchi MM, Bruce JN. 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*, 25, 177-95.
- Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, Okamura H, 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*, 1364, 103-15.
- Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W, 1987. The pineal gland and circadian, opiateergic, immunoregulatory role of melatonin. *Ann N Y Acad Sci*, 496, 67-77.
- Maestroni GJ, 2001. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*. 10, 467-76.
- Magee C, Foradori CD, Bruemmer JE, Arreguin-Arevalo JA, Mccue PM, Handa RJ, Squires EL, Clay CM, 2009. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology*. 150(6), 2813-21.

- Malpoux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V, Thiery JC, 1993. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod*, 48, 752-60.
- Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P, 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: Presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone by in situ microimplant delivery. *Endocrinology*, 139, 1508-16.
- Mantzoros CS, Qu D, Frederich RC, Susulic VS, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS, 1996. Activation of beta 3 adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin independent suppression of food intake in mice. *Diabetes*. 45, 909-14.
- Mangian HF, Li G, Paul GL, Shay NF, 1997. Blood leptin levels are reduced during zinc deficiency induced anorexia. *Nutr Biochem*, 9, 47-51.
- Marino FE, 2002. Methods, advantages and limitations of body cooling for exercise performance. *Br J Sport Med*, 36, 89-94.
- Martin G, Micheal A, Münzberg H, 2008. Mechanism of leptin action and leptin resistance. *Annual Reviews*, 70, 537-56.
- McClain G, Stuart M, Kasarskis E, Humphries L, 1993. Zinc, appetite regulation and eating disorders. *Prog Clin Biol Res*, 380, 47-64
- Mercer, J.G, Hoggard, N, Williams L.M, Lawrence B.C, Hannah L.T, Trayhurn P, 1996. Localization (Ob-Rb) of leptin receptor mRNA and the long form splice variant in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *Federation of European Biochemical Societies*. 387, 113-16.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SA, 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(5), 1761-66.
- Meyer SL, Goodman RL, 1985. Neurotransmitters involved in mediating the steroid-dependent suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in anestrus ewes: effects of receptor antagonists. *Endocrinology*, 116, 2054-61.
- Meyer SL, Goodman RL, 1986. Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in the anestrus ewe. *Biol Reprod*, 35, 562-71.
- Millar RP, Roseweir AK, Tello JA, Anderson RA, George JT, Morgan K, Pawson AJ, 2010. Kisspeptin antagonists: Unraveling the role of kisspeptin in reproductive physiology *Brain Res*. 1364, 81-89.
- Miller DW, Findlay PA, Morrison MA, Raver N, Adam CL, 2002. Seasonal and dose-dependent effects of intracerebroventricular leptin on LH secretion and appetite in sheep. *J Endocrinol*, 175, 395-404.
- Morrison CD, Daniel JA, Holmberg BJ, Djiane J, Raver N, Gertler A, Keisler DH, 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effect on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *J Endocrinol*, 168, 317-24.
- Nagatani S, Zeng YH, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA, 2000. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*, 141, 3965-75.

- National Research Council (NRC) 1985. Nutrient requirements of sheep. Revised edition national academic press, Washington DC. Erişim tarihi, 10 Mayıs 2019, Erişim Adresi, https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=WMrAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Nutrient+requirements+of+sheep&ots=ljoamIaPZ0&sig=5kA0AZfQpi9IL4RC8gXIOTfvPgw&redir_esc=y#v=onepage&q=zinc&f=false
- National Research Council (NRC) 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. Seventh revised edition. National academic press, Washington DC. Erişim tarihi, 10 Mayıs 2019 Erişim adresi, <https://profsite.um.ac.ir/~kalidari/software/NRC/HELP/NRC%202001.pdf>.
- Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA, 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/ neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci*, 29, 11859-66.
- Ninh NX, Thissen JP, Collette L, Gerard G, Khoi HH, Ketelslegers JM, 1996. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) in growth retarded Vietnamese children. *Ann J Clin Nutr* 63, 514-19.
- Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H, 2009. Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol*, 21, 813-21.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M, 2001. Metastasis suppressor gene Kiss1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411(6837), 613-17.
- Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R, 1996. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(11), 3909-13.
- Ott EA, Smith, WH, Harrington RB, Beeson WM, 1966a. Zinc toxicity in ruminants. I. Effect of high levels of dietary zinc on gains, feed consumption and feed efficiency of lambs. *J Anim Sci*, 25, 414-18.
- Ott EA, Smith, WH, Harrington RB, Beeson WM, 1966b: Zinc toxicity in ruminants. II. Effect of high levels of dietary zinc on gains, feed consumption and feed efficiency of beef cattle. *J Anim Sci*, 25, 419-23.
- Ott EA, Smith, WH, Harrington RB, Parker HE, Beeson, WM. 1966c. Zinc toxicity in ruminants. IV. Physiological changes in tissues of beef cattle. *J Anim Sci*, 25, 432-40.
- Ozata M, Ozdemir I, Licinio J, 1999. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 3686-95.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R, 2006. Melatonin - Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*, 273, 2813-38.
- Paredes SD, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, 2009. Phytomelatonin: a review. *J Exp Bot* 60, 57-69.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F, 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269(5223), 540-43.
- Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM, 2003. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*, 17, 221-28.

- Prasad AS, 1991. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr*, 53, 403-12.
- Prasad AS, 1996. Zinc the biology and therapeutics of an ion. *Ann Intern Med*, 125, 142-44.
- Prasad T, Kundu MS, 1995. Serum IgG and IgM responses to sheep red blood cells (SRBC) in weaned calves fed milk supplemented with Zn and Cu. *Nutrition*, 11, 712-15.
- Quershi IZ, Abbas Q, 2013. Modulation of testicular and whole blood trace element concentrations in conjunction with testosterone release following kisspeptin administration in male rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biol Trace Elem Res*, 154, 210-16.
- Rance NE, Young WS, 1991. Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalamus of postmenopausal women. *Endocrinology*, 128, 2239-47
- Rance NE, Bruce TR, 1994. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinol*, 60, 337-45.
- Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA, 2010. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res*, 1364, 116-28.
- Reiter RJ. 1991. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr Rev*. 12 (2), 151-80.
- Reiter RJ. 1996. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol*. 134, 412-20.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pévet M, Pévet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V, 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr. Biol*. 16, 1730-35.
- Revel FG, Ansel L, Klosien P, Saboureau M, Pévet P, Mikkelsen JD Simonneaux V, 2007. Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8, 57-65.
- Richard N, Corvaisier S, Camacho E, Kottler ML, 2009. Kiss1 and GPR54 at the pituitary level: overview and recent insights. *Peptides*, 30(1), 123-29.
- Rink TJ 1995. In search of a satiety factor. *Nature*, 372, 406-07.
- Rucker, R.B, Lönnerdal, B, Keen, JL, 1994. Intestinal absorption of nutritionally important trace minerals. In: L.R. Johnson (ed.): *Physiology of the intestinal tract*. 3rd ed. Raven Press, New York. 3, 2183-02.
- Sakamoto K, Wakabayashi Y, Yamamura T, Tanaka T, Takeuchi Y, Mori Y, Okamura H, 2013. A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect phenomenon in goats. *PLoS one* 18, 8(11):e81017. doi: 10.1371/journal.pone.0081017.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Tsuji T, Masuzaki H, Hiraoka J, Okazaki T, Tamaki M, Hayase M, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K, 1997. Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: Evidence for loss of its satiety effect in VMH lesioned rats. *Endocrinology*, 138, 947-54.
- Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, Nagayama M, 2007. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res*, 42, 231-39.

- Schomerus C, Korf HW, 2005. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci*, 1057, 372-83.
- Sebert ME, Lomet D, Ben Said S, Monget P, Briant C, Scaramuzzi RJ, Caraty A, 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domest Anim Endocrinol*, 38, 289-98.
- Simonneaux V, Ansel L, Revel FG, Klosen P, Pévet P, Mikkelsen JD, 2009. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides*, 30, 146-53.
- Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA 2006a. Kiss1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*, 18, 298-03.
- Smith JT, Clifton DK, Steiner RA, 2006b. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*. 131, 623-30.
- Smith JT, Coolen L, Kriegsfeld L, Sari I, Jaafarzadehshirazi M, Maltby M, Bateman K, Robert L, Goodman R, Tilbrook A, Ubuka T, Bentley G, Clarke I, Lehman M 2008. 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*, 149, 5770-82.
- Smith JT, 2009a. Sex steroid control of hypothalamic kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides*, 30(1), 94-102.
- Smith JT, Li Q, Pereira A, Clarke IJ, 2009b. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 150(12), 5530-38.
- Smith JT, Clarke IJ. 2010. Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Mol Cell Endocrinol*. 5,324(1-2), 102-09.
- Smith JT, Li Q, Yap KS, Shahab M, Roseweir AK, Millar RP, Clarke IJ, 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology*, 152(3), 1001-12.
- Song YM, Chen MD, 2009. Effects of melatonin administration on plasma leptin concentration and adipose tissue leptin secretion in mice. *Acta Biologica Hungarica*, 60, 399-407.
- Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, 1997. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of atp-sensitive potassium channels. *Nature*, 390, 521-25.
- Spears JW, 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 58(1,2), 151-63
- Spears JW, Kegley EB, 2002. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *Journal of Animal Science*.80(10), 2747-52.
- Suzuki N, Hattori A. 2002. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res*, 33(4), 253-58.
- Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A, 2008. Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res*. 45, 229-34.
- Tamarkin L, Baird CJ. and Almeida OFX, 1985. A coordinating signal for mammalian reproduction? *Science*. 227(4688), 714-20.

- Tamura H, Nakamura Y, Narimatsu A, Yamagata Y, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N, 2008. Melatonin treatment in peri- and postmenopausal women elevates serum high-density lipoprotein cholesterol levels without influencing total cholesterol levels. *J Pineal Res*, 45, 101-05.
- Tanja L, 2003. Melatonin- receptoren im rückenmark der ratte: qualitatives nachweis mittels rt-pcr und elektrophysiologische charakterisierung im heterologen expressionssystem der xenopus oozyten. Doktora Tezi Münster Üniversitesi.
- Thillard MJ, 1959. Vertebral column deformities following epiphysectomy in the chick. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 248, 1238-40.
- Thompson EL, Amber V, Stamp GW, Patterson M, Curtis AE, Cooke JH, Appleby GF, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR, Murphy KG, 2009. Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *Br J Pharmacol*.156(4), 609-25.
- Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK, 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*, 41, 354-58.
- Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B, 2002. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, 143(1), 84-90.
- True C, Kirigiti M, Ciofi P, Grove KL, Smith MS, 2011. Characterisation of arcuate nucleus kisspeptin/neurokinin B neuronal projections and regulation during lactation in the rat. *J Neuroendocrinol*. 23, 52-64.
- Tsutsui K, Haraguchi S, Inoue K, Miyabara H, Suzuki S, Ogura Y, Koyama T, Matsunaga M, Vaudry H. 2009: Identification, biosynthesis, and function of 7 α -hydroxypregnenolone, a new key neurosteroid controlling locomotor activity, in nonmammalian vertebrates. *Ann N Y Acad Sci*, 1163, 308-15.
- Tsutsui K, Matsunaga M, Miyabara H, Ukena K, 2006. Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 305, 733-42.
- Tsutsui K, 2008a. Progesterone biosynthesis and action in the developing neuron. *Endocrinology*, 149, 2757-61.
- Tsutsui K, Inoue K, Miyabara H, Suzuki S, Ogura Y, Haraguchi S, 2008b. 7 α -Hydroxypregnenolone mediates melatonin action underlying diurnal locomotor rhythms. *J Neurosci*, 28, 2158-67.
- Tsuzuki K, Okamoto-Miunu K, Mizuno K, 2004. Effects of humid heat exposure on sleep, thermoregulation, melatonin and microclimate. *J Therm Biol*, 29, 31-34.
- Üstündağ B, Canatan H, 1999. Melatonin: Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal giderici. *Firat Tip Dergisi*. 1,7.
- Vallee BL, Falchuk KH. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73(1), 79-118.
- Viguie C, Caraty, A, Locatelli A, Malpoux B, 1995. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) secretion by melatonin in the ewe. II. Changes in N-methyl-D,L-aspartic acid-induced LHRH release during the stimulation of luteinizing hormone secretion by melatonin. *Biol Reprod*, 52, 1156-61.
- Vila G, 2010. Ein Hormon stellt sich vor: Kisspeptin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 3(2), 33-34.

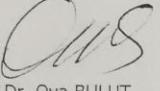
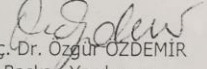
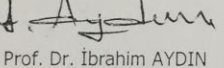


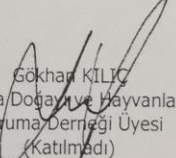
- Vries L, Shtaf B, Phillip M. and Gat-Yablonski G, 2009. Kisspeptin serum levels in girls with central precocious puberty. *Clin Endocrinol*, 71, 524-28.
- Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG, 2008. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology*, 149, 32-39.
- Wang M, Chen L, Clark G, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR, Wenner BR, Bain JR, Charron MJ, Newgard CB, 2010. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *PNAS*. 107, 4813-19.
- Wajs E, Lewinski A, 1992. Inhibitory influence of late afternoon melatonin injections and the counter- inhibitory action of melatonin- containing pellets on thyroid growth process in male Wistar rats: Comparison with effects of other indole substances. *J pineal res*, 13(4), 158-66.
- Wichmann MW, Haisken JM, Ayala A, Chaudry IH, 1996. Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J Surg Res*, 65, 109-14.
- Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA, 2003. Melatonin receptors and their regulation: Biochemical and structural mechanisms. *Life Sciences*, 72, 2183-98.
- Wright ML, Pikula A, Babski AM, Labieniec KE, Wolan RB, 1997. Effect of melatonin on the response of the thyroid to thyrotropin stimulation in vitro. *Gen Comp Endocrinol*. 108(2), 298-05.
- Wrightand CL, Spears JW. 2004.Effect of Zinc Source and Dietary Level on Zinc Metabolism in Holstein Calves. *J Dairy Sci*, 87(4), 1085-91.
- Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, Seeley RJ, 2000. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol*, 51, 255-77.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM, 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505), 425-32.
- Zhang S, Blache D, Blackberry MA, Martin GB, 2004. Dynamics of the responses in secretion of LH, leptin and insulin following an acute increase in nutrition in mature male sheep. *Reprod Fertil Dev*, 16, 823-29.
- Zhou Q, Chen H, Yang S, Li Y, Wang B, Chen Y, Wu X, 2014. High-fat diet decreases the expression of kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 26(12), 127.
- Zwirska-Korczała K, Ostrowska Z, Kucharzewski M, Marek B, Swietochowska E, Kos-Kudła B, Buntner B, 1991. Circadian variations of serum triiodothyronine, thyroxine, corticosterone and lipids in starved rats. *Endocr Regul*, 25(3), 165-69.

Şekillerin Kaynakları.

- Şekil 1.1. Friedman, JM. and Halaas, JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature, 395, 763-770.
- Şekil 1.2. Martin G, Micheal A, and Münzberg H. 2008. Mechanism of leptin action and leptin resistance. Annual Reviews, 70, 537-556
- Şekil 1.3. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8390631.htm. Erişim tarihi, 10.Mays 2019
- Şekil 1.4. Kauffman AS, Clifton D, Steiner RA, 2007. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of the reproduction. Trends in neurosciences. 30(10), 504-511
- Şekil 1.5. <https://www.humanbrainfacts.org/hypothalamus.php>. Erişim Tarihi, 10 Mayıs 2019
- Şekil 1.6.<http://www.biokurs.de/melatde.htm>. 5 Aralık 2018
- Şekil 1.7. Alan K, 2009. Sepsisli olgularda melatonin düzeylerinin prognoz ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Şekil 1.8.Tanja L 2003. Melatonin- receptoren im rückenmark der ratte: Qualitatives nachweis mittels rt-pcr und elektrtrophysiologische charakterisierung im heterologen expressionssystem der xenopus oozyten. Doktora Tezi Münster Üniversitesi.

7. EKLER

EK- A Etik kurul kararı.

Toplantı Tarihi	22.06.2017	Toplantı Sayısı	2017/07	Karar Sayısı	2017/62
<p>S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Behiç SERPEK tarafından sunulan "Koçlarda çinko takviyelerinin plazma kisspeptin ve melatonin düzeyleri üzerine etkisi" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.</p> <p>Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "Uygun olduğuna" oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
 Prof. Dr. Oya BULUT Başkan			 Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı		
 Prof. Dr. İbrahim AYDIN Üye			 Doç. Dr. Ayşe ER Raportör Üye		
 Doç. Dr. Özlem DERİNBAŞ EKİCİ Üye		 Gökhan KILIÇ Konya Doğan Üye Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)		Gökhan GÜLER Sivil Üye (Katılmadı)	

Fatih KÜÇÜK
S.O. Veteriner Fakültesi
Fakülte Sekreteri

ASLI GIBİDİR

T.C. SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI

8. ÖZGEÇMİŞ (Halil HARMAN)

Konya'nın Selçuklu ilçesinde 20.11.1988'de doğdu. İlköğretimini 1994-2002 yılları arasında Konya'nın Ilgın ilçesinde Mehmet Akif Ersoy ilköğretim okulunda tamamladı. Lise eğitimini 2002-2006 yılları arasında Konya'nın Ilgın ilçesinde Ilgın Şehit Selam Kemer Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesine başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı ve halen tez döneminde devam etmektedir. 2013 yılında Karaman İl Tarım ve Orman Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak göreve başladı. 2016-2018 yılları Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsünde veteriner hekim olarak görev yaptı. Evli ve bir çocuk babası olup 2018 şubat ayı itibariyle Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Müdürlüğünde halen veteriner vekim olarak görev yapmaktadır.

