



T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



HİPOTALAMİK NÖROENDOKRİN HÜCRE AKTİVASYONUNDA GLUTAMAT AGONİSTLERİNİN ROLÜ

İLKER MUSTAFA KAFA

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2023





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



HİPOTALAMİK NÖROENDOKRİN HÜCRE AKTİVASYONUNDA GLUTAMAT AGONİSTLERİNİN ROLÜ

İLKER MUSTAFA KAFA

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“HİPOTALAMİK NÖROENDOKRİN HÜCRE AKTİVASYONUNDA GLUTAMAT AGONİSTLERİNİN ROLÜ” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

İLKER MUSTAFA KAFA

25/09/2023

İMZA

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

25/9/2023

Adı Soyadı: İlker Mustafa KAFA

Anabilim Dalı: TIP/HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

Tez Konusu: HİPOTALAMİK NÖROENDOKRİN HÜCRE AKTİVASYONUNDA
GLUTAMAT AGONİSTLERİNİN ROLÜ

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	✓	☐	
Dış Kapak Sayfası	✓	☐	
İç Kapak Sayfası	✓	☐	
Kabul Onay Sayfası	✓	☐	
Sayfa Düzeni	✓	☐	
İçindekiler Sayfası	✓	☐	
Yazı Karakteri	✓	☐	
Satır Aralıkları	✓	☐	
Başlıklar	✓	☐	
Sayfa Numaraları	✓	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	✓	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	✓	☐	
Kaynaklar	✓	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY SAYFASI.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Hipotalamus.....	6
2.2. Hipotalamus ve Glutamaterjik Sistem.....	9
2.3. Kisspeptinler.....	14
2.3.1. KISS1R Sistemi, Hipotalamus ve GnRH	18
2.3.2. Kisspeptin Nöronlarının Hipotalamik Dağılımları.....	22
2.4. Oreksin Nöronları.....	25
2.5. Vazopressin Nöronları.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar.....	31
3.2. Oreksin, Vazopressin ya da Kisspeptin Nöronlarında Aktivasyonun Gösterilmesi.....	33
3.3. Oreksin ve Vazopressin Nöronlarında Veziküler Glutamat Taşıyıcıları (VGluT2, VGluT3) için İmmunoperoksidaz Boyaması.....	34
3.4. Kisspeptin Nöronlarında GluR1 (GluA1), GluR2 (GluA2) ve NMDAR1 (GluN1) Reseptör Alt Birim Proteinlerinin Ekspresyonunun Gösterilmesi.....	34
3.5. Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar.....	35
3.6. Hücre Sayımları ve İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	35
4.1. Kisspeptin Nöronlarında Normal Dağılım ve Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İncelenmesi.....	38
4.2. Oreksin Nöronlarında Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İncelenmesi.....	54
4.3. Vazopressin Nöronlarında Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İncelenmesi.....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	69
6. KAYNAKLAR.....	75
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	87
8. EKLER.....	88
9. TEŞEKKÜR.....	90
10. ÖZGEÇMİŞ.....	91

TÜRKÇE ÖZET

Glutamat agonistlerinin hipotalamustaki belirli nöron grupları üzerine olan etkileri, çalışmanın ana amacını oluşturmuş ve bu çerçevede sıçan beyinlerinde, vazopresin, oreksin ve kisspeptin nöronlarının dağılımları ve glutamaterjik sistem ile olan reseptör ve aktivasyon düzeyindeki ilişkileri incelenmiştir. İlgili alanlarda, farklı glutamat agonistlerinin ve antagonistlerinin adı geçen nöron gruplarına olan etkileri immünohistokimyasal yaklaşımla araştırılmıştır. Çalışmanın ana iskeletinde, glutamatın NMDA ve non-NMDA reseptörlerine ait agonistlerinden AMPA ve kainik asitin (ve antagonistlerinin) intraperitoneal olarak uygulanmasını takiben ilgili nöron popülasyonları c-Fos ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir. Oreksin nöronları açısından, bu nöron grubunun, glutamaterjik inervasyon aldığı, AMPA ve kainik asit reseptör altbirimlerini eksprese ettikleri ve non-NMDA agonistleri ile aktivasyon gösterip, uygun antagonist ile baskılanabildiği gösterilmiştir. Vazopresinerjik sistem açısından da vazopressin nöronları üzerinde glutamat agonistlerinin uyarıcı etkileri olduğu, glutamatın etkisini vazopressin nöronlarında reseptörleri aracılığı ile yaptığı bulunmuştur ve daha ileri çalışmalarımız için bu sonuçların ışık tutucu ve yol gösterici olduğu düşünülmüştür. Nispeten daha yeni bir alan olan kisspeptin nöronları konusunda elde ettiğimiz dağılım alanları ve glutamaterjik sistemle olan bağlantılarına yönelik sonuçlar, bu nöronların çalışma alanımızın da ötesinde daha pek çok fonksiyonel bağlantısı ve görevi olduğunu da göstermektedir. Çalışmalarımız sonucunda da literatürdeki veriler ile uyumlu olarak kisspeptin nöronlarının glutamat agonistleri ile aktivasyon gösterip, uygun antagonist ile baskılanabildiği morfolojik düzeyde gösterilmiş ve diğer metodlar ile elde edilen sonuçlara katkı sağladığı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Glutamat, Glutamaterjik sistem, Kisspeptinler, Oreksin, Vazopressin.

İNGİLİZCE ÖZET

The Role of Glutamate Agonists in Hypothalamic Neuroendocrine Cell Activation

The effects of glutamate agonists on certain neuron groups in the hypothalamus constituted the main purpose of the study, and in this context, the distribution of vasopressin, orexin and kisspeptin neurons in rat brains and their relationship with the glutamatergic system at the level of receptor and activation were investigated. In the main content of the study, related neuron populations were evaluated for c-Fos expression following intraperitoneal administration of glutamate receptor agonists NMDA, AMPA and kainic acid (and its antagonists). In terms of orexin neurons, it has been shown that this group of neurons receives glutamatergic innervation, expresses AMPA and kainate receptor subunits, and can be activated by non-NMDA agonists and suppressed by the appropriate antagonist. And, in terms of vasopressinergic system, it was found that glutamate agonists have stimulating effects on vasopressin neurons, glutamate exerts its effect on vasopressin neurons through its receptors, and these results are thought to be light-shining and guiding for our further studies. The results of the distribution areas and their connections with the glutamatergic system, which we obtained for kisspeptin neurons, which is a relatively new field, also show that these neurons have many more functional connections and tasks beyond our study area. As a result of our studies, it has been shown at the morphological level that kisspeptin neurons can be activated by glutamate agonists and suppressed by the appropriate antagonist, in line with the data in the literature, and it is thought to contribute to the results obtained with other methods.

Keywords: Glutamate, Glutamatergic system, Kisspeptins, Orexin, Vasopressin.

1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemindeki nöromodülatörlerin, kimyasal yapılarına göre, amin yapılı, aminoasit yapılı ve peptit yapılı olmak üzere üç farklı grupta toplandıkları bilinmektedir. Aminoasit yapıdaki nöromodülatörler, nöronal düzeydeki etkilerinin baskılayıcı ya da uyarıcı olup olmadıklarına açısından da “inhibitör” ve “eksitator” olarak iki gruba ayrılmaktadır. İnhibitör özellikli gamma amino-bütirik asit (GABA), taurin, glisin, prolin ve eksitator etkili aspartat ve glutamat en çok bilinen aminoasit yapılı nöromodülatörler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bunların bir kısmı da aminoasit yapılarına rağmen peptit yapılı nöromodülatörlerden daha çok amin yapılı olanlarla benzer niteliklerdeki sentez, salınım ve kinetik özelliklere sahiptirler. Sinir uçlarında glutaminaz enziminin etkisiyle glutaminin hidrolizi ile glutamatın oluştuğu bilinmektedir. Glutamatın bir kısmının ise oksoglutarat oksidasyonu ve transaminasyonu yolları ile glukozdan sentezlendiği de bilinmektedir. Sinir uçlarından salınımı ise Ca^{++} bağımlıdır. Glutamat eksitator bir nörotransmitter olarak hipotalamusta yaygın olarak bulunmaktadır ve glutamat pozitif sinir terminalleri immünohistokimyasal yöntemlerle, supraoptik (SON), paraventriküler (PVN), arkuat ve suprakiazmatik (SCN) çekirdeklerde presinaptik yerleşimli olarak gösterilmiştir (Van Den Pol, & Trombley 1993). Glutamatın, nöroendokrin sistem içerisinde önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir ve pek çok hormon aktivitesinin kontrolü ile ilişkili önemli bir nöromodülatör olarak görülmektedir (Brann, 1995). İyonotropik ve metabotropik reseptörleri üzerinden aktivite göstermekte, iyonotropik reseptörleri, glutamat agonistlerine olan afiniteleri göz önünde bulundurularak “ α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropionat” (AMPA), “kainik asit” ve “N metil D aspartat” (NMDA) olmak üzere üç kısımda incelenmektedir (Hollmann, & Heinemann, 1994). Bu alt tip reseptörler Na^+ , K^+ , ve Ca^{++} iyon kanalları üzerinden etki yaparlarken, metabotropik reseptörler G-protein aracılığı ile Ca^{++} ya da adenilat siklaz aktivitesi üzerinden etki göstermektedirler (Brann, & Mahesh, 1994). AMPA reseptörleri GluA1-4, kainik asit reseptörleri GluK1-5 ve NMDA reseptörleri GluN1, GluN2A-D ve GluN3A-B altbirimlerinden oluşmaktadır (Bettler & Mulle, 1995; Dingledine, 2012; Mori, & Mishina, 1995). Sözü edilen altbirimler homodimerik ya da heterodimerik biçimlerde (sırasıyla, bir tek alt yapıdan ya da birden fazla alt yapıdan

oluşan), fonksiyonel reseptör kanalları olan, iyon kanallarını oluşturmaktadır (Howe, 1996; Monyer ve ark., 1992).

Çalışmamız açısından hipotalamik nöron gruplarından olan vazopressin ve oreksin nöronlarına bakılacak olursa sıvı ve tuz dengesinin sağlanmasında vazopressin nöronlarının etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Glutamat agonistlerinin vazopressin nöronlarını uyarak vazopressin salınımına neden oldukları da bildirilmiş ve vazopressin nöronlarında AMPA ve NMDA reseptör altbirimlerinin varlığı gösterilmiştir (Morsette, Swenson, Badre, & Sladek, 1998; Onaka, & Yagi, 2000). Ancak kainik asit reseptörleri açısından yeterli çalışma bulunmamaktadır. Başka bir hipotalamik nöroendokrin hücre olan oreksin nöronlarının da uyanıklılık ve besin alımı üzerindeki etkileri bilinmektedir ve hipotalamus içerisinde ayrıca da hipofiz üzerine etki gösterecek şekilde nöroendokrin etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Shirasaka, Kunitake, Takasaki, & Kannan, 2000). Oreksin A ve B olarak ya da hipokretin olarak isimlendirilen oreksinerjik nöronların genel popülasyonu, hipotalamusda özellikle perifornikal alanda yerleşmiştir. Hipoglisemi ile birlikte bu nöronların aktive oldukları bilinmektedir; ancak oreksin nöronlarının kontrolünde olan nörotransmitter sistemlerinin araştırıldığı çalışmalar az sayıdadır (Ferguson, & Samson, 2003). Glutaminerjik sistem ile olan ilişkileri ise tam olarak açık değildir.

Haklarında daha az bilgi bulunan kisspeptin nöropeptid ailesi, “Kiss-1” geni (1q32) tarafından transkript edilen öncül yapıdaki bir proteinden türeyen peptitlerdir (Gottsch ve ark., 2009). “Kiss1” geni öncelikle 54 aminoasitlik bir proteine parçalanabilen, hidrofobik ve 145 aminoasitlik bir proteini kodlamaktadır. Öncül proteinden türeyen 54 aminoasitlik “metastin” ile birlikte 10, 13 ve 14 aminoasitlik daha kısa protein dizileri kisspeptinler olarak adlandırılmaktadır (Lee ve ark., 1996; Mikkelsen, & Simonneaux, 2009). “Kiss” kelimesindeki “ss” takısı bir anlamda supresör görevinde olan “suppressor sequence” dizisine karşılık gelmektedir. Bu gen, Pensilvanya’daki Hershey bölgesinde bulunduğundan dolayı ve bölgenin bilinen ünlü bir çikolatası olan Kiss markasına ithaf edilip, “Ki” öneki de eklenip “Kiss-1” adı verilerek, bilimsel dünyada da bu şekilde kabul edilmiştir (Lee ve ark., 1996; Seminara, 2005). 1996 yılında keşfedilen “Kiss1” geni, invazyon özelliklerini yitirmiş

melanoma hücrelerinde yüksek düzeyde görülmüştür (Lee ve ark., 1996). Metastin olarak bilinen Kisspeptin-54 transkriptinin, “GPR54” (G protein ilişkili reseptör-54) reseptörüne endojen bir ligandlık yaptığı ise 2001 yılında üç ayrı grubun çalışmaları ile gösterilmiştir (Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001). Ayrıca, kisspeptin proteinlerinin “GPR54” reseptörü ile etkileşimi ile birlikte fosfolipaz C aktifleşmektedir. Hücre içi “inozitol 1,4,5 trisfosfat”, Ca^{++} düzeyleri yükselmekte, aynı zamanda, ERK ve p38 protein-kinaz sinyal yolları etkinleşmektedir (Lee ve ark., 1996).

Metastinin “GPR54” reseptörüne bağlanma afinitesinin güçlülüğü fizyolojik bir ligand olarak reseptör aktivasyonunda görev aldığını göstermektedir. Bu ligand reseptör ilişkisinin C terminallerindeki amid gruplarının varlığına gereklilik duyduğu bilinmektedir (Colledge, 2008). “Kiss-1” ve “GPR54” gen mutasyonlarının deney hayvanlarında hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (d'Anglemont de Tassigny, Fagg, Carlton, & Colledge, 2008; Roux, Genin, Carel, Matsuda, Chaussain, & Milgrom, 2003; Seminara, 2005). Ayrıca “GPR54” gen aktivasyonu ile insanlarda puberte prekoks gözlenmiştir (Teles ve ark., 2008). Kemiricilerde kisspeptinlerin verilmesi ile preoptik alanda gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) nöronlarında “GPR54” mRNA düzeyleri ve c-Fos aktivasyonunda artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, kisspeptin immunoreaktif sinir terminallerinin GnRH immunoreaktif hücreler ile yakın ilişki içerisinde oldukları bilinmektedir (Irwig ve ark., 2004; Matsui, Takatsu, Kumano, Matsumoto, & Ohtaki, 2004). Kisspeptinlerin periferik yollar ile verilmesi ile de testosteron seviyelerinde artış olduğu bilinmektedir. Kisspeptin m-RNA’sını eksprese eden nöronların, ARC, anteroventral periventriküler çekirdek (AVPV) ve PVN gibi gonadotropin salınımının nöroendokrin düzenlenmesinde rol alan hipotalamik bölgeler ile ilişki içerisinde oldukları in situ hibridizasyon tekniği ile gösterilmiştir. Ancak kisspeptin peptitlerinin “GPR54” aktivasyonu ile pubertenin başlangıcında rol oynadığı, ayrıca hipotalamo-hipofizer gonadal (HHG) aksinin düzenlenmesinde de etkin rolleri olduğu yeni ortaya çıkarılmış olsa da haritalandırma anlamında histolojik dağılım ve yerleşimleri hala net olarak anlaşılmış değildir. İmmunohistokimyasal olarak kisspeptin immunoreaktif hücrelerin üçüncü ventrikülün rostral kısımlarında periventriküler alanlarda, arkuat

çekirdekte ve daha dağınık olarak da dorsomedial nükleus ve posterior hipotalamusta oldukları ise bazı çalışmalarda gösterilmiştir. (Gottsch ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2006).

GnRH nöronlarının hipofizden salınan “folikül-uyarıcı-hormon” (FSH) ve “luteinize-edici-hormon” (LH) gonadlar üzerinde etkilerini gösterdikleri bilinmektedir. Aktive olan gonadlarla birlikte de puberte başlamaktadır (Kuohung, & Kaiser, 2006; Hofmann, 2006). “GnRH1” geni (Cr8) preoptik alanda 92 aminoasitlik bir preprohormonu kodlamakta ve bu protein dizisinin son ürünü olarak da bir decapeptid olan GnRH üretilmektedir. Bir nörohormon olarak nöronda sentezlenip nöron terminalinden salınmaktadır. GnRH salgılayan nöronlar tarafından üretilip median eminente hipofizer portal sisteme salınmakta, portal sistemle hipofize taşınmakta, gonatotropik hücrelerde kalsiyum ve protein kinaz ile ilişkili olan fosfolipaz C beta izoformu üzerinde etkili olan “gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörü” (GNRHR) isimli reseptör üzerinden etki etmektedir. Bu tetikleyici mekanizma LH ve FSH isimli gonadotropinlerin sentez ve sekresyonu ile sonuçlanmaktadır. GnRH dakikalar içerisinde proteolize uğramaktadır. Gonadotropin sentez ve sekresyonu GnRH akımının büyüklük ve frekanslarına, ayrıca androjen ve östrojenlerin geribildirimlerine bağlı olarak değişmektedir. Erkeklerde sabit bir GnRH akımı söz konusu iken dişilerde menstrual siklus ile değişiklik göstermektedir. Foliküler gelişim, ovulasyon ve spermatogenezisi yöneten tek hormon olarak GnRH pulsatif olarak salınmaktadır (Grumbach, 2002). GnRH aktivitesi bilindiği gibi çocukluk dönemlerinde zayıf iken puberte ile güçlenmektedir. Hipotalamustan GnRH salınımı fetal dönemlerde başlayıp tüm bu fetal gelişim dönemleri boyunca aralıklı olarak devam etmektedir. Doğumdan sonraki 6-12 aylık dönem içerisinde GnRH düzeyi kademeli olarak azalmakta takiben çocukluk dönemine ulaşıldığında ise belirli bir düzeyde kalmaktadır. Bu baskılanmanın nedeni tam olarak açık değildir (Rogol, 2004). GnRH nöronları geribildirimlerin yanı sıra, afferent uyarılar açısından norepinefrin, glutamat, dopamin ve GABA nörotransmitterleri ile ilişkili nöronlar ile de kontrol altındadır. Örnek olarak dopamin GnRH üzerinden LH salınımını uyarmaktadır (Limonta, Moretti, Marelli, & Motta, 2004). GnRH salınımının hücresel düzeyde kisspeptin aracılığı ile direkt yoldan olup olmadığı ya da oluyorsa nasıl bir

mekanizmanın bu yollara dahil olduğunda tam olarak açık değildir. Kisspeptin reseptör aktivasyonu Fosfolipaz C ve inositol trifosfat hücre içi ikincil haberci sistemleri ile ilişki içerisinde (Liu, Lee, & Herbison, 2008). Kisspeptinlerin pek çok iyon kanalını düzenleyen Fosfolipaz C ve Ca^{++} üzerinden GnRH nöronlarını uyardığı bilinmektedir. Kemiriciler, koyun, maymun ve insanda kisspeptin verilmesi ile GnRH ve gonadotropin sekresyonu stimülasyonu olmaktadır. GPR54 -/- farelerde anormal seksüel gelişim ve düşük gonadotropin seviyeleri görüldüğü de bildirilmiştir (Funes ve ark., 2008). Bu bilgiler ile kisspeptin immünoreaktivitesi gösteren nöronların dağılımlarının HHG aksı gibi yaygın merkezi etkileri olan sistemler ile olan fonksiyonel ilişkilerinin ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmaların önemli olduğu görülmektedir.

Glutamat agonistlerinin hipotalamustaki belirli hücre grupları üzerine olan etkileri, çalışmamızın ana amacını oluşturmuş ve bu çerçevede sıçan beyinlerinde vazopressin, oreksin ve kisspeptin nöronları ilgili alanlarda, farklı glutamat agonistlerinin etkileri altında, mikroskobik düzeyde incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerimizde glutamat agonistlerinin vazopressin, oreksin ve daha dar çerçevede, nispeten daha yeni bir grup olan kisspeptin nöronları üzerindeki aktivasyon etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipotalamus

Diensefalonun en alt parçası olarak hipotalamusun iyi belirlenmiş sınırları bulunmaktadır. Anterior komissür, lamina terminalis ve optik kiazma önünden çizilen çizgi rostraldeki sınırını oluştururken, arkada mamiller cisim, üstte hipotalamik sulkus, altta tuber cinereum, yanlarda da internal kapsüle kadar uzanan hipotalamik parçalar ile lokalize olmakta ve sınırlanmaktadır. Hipotalamusun içinde yoğun hücre bulunan alanlar da hipotalamik çekirdekler olarak farklı isimlendirmeler altında incelenmektedirler. Bu çekirdekler genelde belirgin sınırları olan yapılar olmamakla birlikte, buna ek olarak hücresel uzantıları çoğu kez alan sınırlarını taşmakta ve uzak alanlara projekte olmaktadır. Ayrıca hipotalamik çekirdekler kimyasal ve fonksiyonel olarak heterojenite gösterebilmektedirler. Lamina terminalis ile optik kiazmanın arka sınırı arasında kalan çekirdekler anterior/supraoptik çekirdekler; optik kiazma ile mamillar cisimcikler arasındakiler medial/tuberal ve mamiller cisimciklerin gerisindeki hipotalamik çekirdekler de posterior/mamillar çekirdekler olarak klasik anlamda sınıflandırılmaktadırlar (Conn, 2008).

Çalışmalarımızla ilgili olan çekirdeklerden PVN kama şeklindedir ve 3. ventriküle komşu olarak uzanmaktadır. Bu çekirdekteki magnosellüler nöronlar büyük perikaryaları, parvosellüler nöronlar ise küçük perikaryaları ile ayırt edilebilirler. Magnosellüler nöronların aksonları nörohipofizde sonlanırken, parvosellüler nöronların aksonları medyan emineste hipofizyal portal damarların primer kapiller yatağına kadar uzanırlar. Bir başka ilgi alanımızdaki çekirdek olan SON optik traktusun başlagıcının hemen üstünde yerleşerek, anterolateralde geniş ve posteromedialde daha küçük birer alt çekirdeğin birleşiminden oluşmakta ve bu iki alt çekirdek birbirlerinden dar bir hücre dizisi bandı ile ayrılmaktadırlar. Bu çekirdekteki nöronlar, koyu boyanan magnosellüler karakterde ve aksonları nörohipofizde sonlanan hücrelerdir. Paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerdeki nöronların aksonları bir demet halinde inerek “hipotalamo hipofizer trakt” olarak nitelendirilmektedir. Magnosellüler ve parvosellüler hücreler vazopressin ve oksitosin üretmektedirler. Bir

başka önemli alan olan SCN retinohipotalamik girdiler almakta olup; ısı döngülerini, uyuma / uyanıklılık döngülerini ve belirli hormon sistemlerinin zamanlanmalarındaki sirkadiyen değişiklikleri kontrol eden bir saat gibi davrandığı düşünülmektedir. Periventriküler çekirdek küçük perikaryaları olan ve ön hipofizin kontrolünde görev alan bazı salgılatıcı ve salgılamayı inhibe edici faktörler içeren hücreler içermektedir. Anterior hipotalamus ayrıca “*circumventrikular*” organlar olarak isimlendirilen bazı farklılaşmış telensefalik alanlarla da ilişkili olarak görülmektedir. “Organum vasculosum lamina terminalis (OVLT)” ve “subfornikal organ” bunlara örnek olarak verilebilir. Bu alanlar kan beyin bariyeri açısından zayıf alanlar olup kandaki belirli değişimleri kolayca tespit edebilecek olan yapılardır. Kan osmolaritesinin “*circumventrikular*” organlarda bulunan anjiyotensin II reseptörleri tarafından algılanması ile kan basıncı düzenlenmesi ve susama gibi fonksiyonlarda da rol oynamaktadırlar (Johnson, 1985). OVLT ayrıca GnRH yolu ile LH sentezinde fonksiyon göstermektedir. Anterior hipotalamik alan SON’nin kaudal parçasına denk gelecek şekilde biterken iki ayrı orta grup çekirdek ortaya çıkmaktadır: Dorsomedial ve ventromedial çekirdekler. Dorsomedial çekirdek küçük hücreler, ventromedial çekirdek ise yoğun ve gruplaşmış hücreler ile ayırt edilebilmektedir. Her iki çekirdek de yiyecek alımı ile ilişkili fonksiyon göstermektedirler. İki çekirdeğin de lezyonu hiperfaji ile sonuçlanmakta ve bu da ilgili alanların yiyecek alımını inhibitör olarak etkilediklerini göstermektedir. Ventromedial çekirdek aynı zamanda gonadal steroidler olan östrojen ve testosteron için reseptörler de taşımaktadır. Bu açıdan kalorik yiyecek alımı monitorizasyonu, üreme davranışları ve adenohipofizden hormon salınımı gibi olaylarda rol oynadıkları düşünülmektedir (Braak, & Braak, 1992; Johnson, 1985).

Arkuat çekirdek de medial hipotalamik alanda başlamaktadır. Bu çekirdekteki parvosellüler nöronlar kısa aksonlu hücrelerdir ve bazıları hipotalamo-hipofizer yolun primer kapiller yatağında sonlanmaktadır. Bu alanda hipotalamusun da bazal kısımlarına denk gelecek şekilde pek çok memelide GnRH nöronları bulunmaktadır. Ancak sıçan, koyun gibi bazı tür memelilerde bu alandaki GnRH nöronları sayıca nispeten azdır ya da çok az miktarda bulunabilmektedirler. GnRH nöronu bulunan türlerde bu nöronların uzantıları yine bazal bölgelerde medyan eminense doğru devam

eder ve bazıları infundibular bölgeye hatta nörohipofize kadar girebilmektedir. Arkuat çekirdeğin diğer fonksiyonları prolaktin ve büyüme hormonu salınımının kontrolü olarak görülmektedir. Bu alanda dopamin, prolaktin inhibe edici hormon ve büyüme hormonu salgılatıcı hormon açısından zengin hücreler bulunmaktadır. Ayrıca beta endorfinden zengin hücreler bulunmakta ve bunlar pek çok hipotalamik ve ön beyin alanlarına projeksiyonlar göndermekte, duygusal davranışlar ve endokrin fonksiyonlarda rol oynadıkları bilinmektedir (Johnson, 1985; Korf, & Müller, 2021). Arkuat çekirdek ayrıca son yıllarda tekrar eden araştırmalar ile kisspeptin nöronlarını da içeren bir bölge olarak görülmektedir (Xie ve ark., 2022).

Vertebralılarda beynin otonomik ve limbik parçalarının bir üyesi olan hipotalamus, dış etkenlerin bilgilerini de toplayarak, hücrelerin iç yapılarını belirli dar limitlerde tutan bir düzenleyici görevindedir. Söz konusu dış etkenler, ısı değişiklikleri, enerji ve savunma gereksinimleri gibi en temel uyaranlardır. Hipotalamusun ince ayarı sayesinde hücresel iç çevre tutarlı kalmaktadır (Lemaire, Cao, Yoon, Long, & Levine, 2021). Hipotalamusun homeostazı sağlama görevi iki sistem üzerinde yapılmaktadır ki bunlar endokrin ve sinir sistemleridir. Hipotalamus tarafından düzenlenen nöral işlevlere bakıldığında bunlar arasında visseral termoregülatör, kardiovasküler otonomik işlevler, seksüel, duygusal, metabolik ve maternal davranışlar sayılabilir. Önhipofiz hormonlarının sentez ve ekspresyonu, hipotalamustaki özel nöronlar tarafından yapılmakta ve adenohipofize hipotalamo-hipofizyal portal sistem olarak isimlendirilen vasküler bir yol ile taşınarak, adenohipofizdeki özel hormonların sentez ve sekresyonunu uyaran ya da inhibe eden peptidler ve aminler tarafından düzenlenmektedir. Arka hipofiz yani nörohipofiz hormonları ise spesifik hipotalamik alanlardaki nöronlar tarafından sentez edilen ve hipotalamo hipofizer yol aracılığı ve aksonal transport ile buraya taşınıp sinüzoidlere salınarak kana verilen hormonlardır (Conn, 2008).

Dekapeptid yapıda bir hormon olan GnRH, hipofizer portal sistem yoluyla taşınarak ön hipofizde gonadotropinlerin salınımını uyarmaktadır. GnRH, devamlı infüzyonla etkisi düşüktür ve pulsatil bir şekilde salgılanmaktadır. Etkilediği gonadotropinler de pulsatil olarak salınırlar. GnRH nöronları mediobazal hipotalamusta

ve ön hipotalamusta preoptik çekirdekte bulunmaktadır. Puberte öncesinde GnRH az düzeyde ve sürekli salgılanmaktayken pulsatil ve yeterli miktarda salgılandığında puberte başlatılmaktadır. Kadınlarda östrojen ve progesteron, erkeklerde testosteron ve inhibin direkt ve indirekt yollarla ön hipofizin gonadotrop salınımını baskılar. GnRH analoglarının insanlarda gonadotropin sentezi ve salınımında önce stimülasyon sonra da baskılanma yaptıkları gonadlar üzerinde de bu yolla baskılayıcı etkilerinin oldukları bilinmektedir. HHG aksı, insan türünün yaşam sikluslarında en önemli fonksiyonlardan biri olan üreme yeteneğinin ve cinsiyet karakterlerinin kazanılması ve takiben sürdürülmesine aracılık etmektedir. Ayrıca diğer sistemlerle de derinlemesine fonksiyonel ilişkileri olan merkezi ve üst hiyerarşisinde görev alan bir sinir sistemi bölgesi olarak bilinmektedir. Puberte ile birlikte nasıl farklı aktivasyon gösterdiği uzun yıllarca gizliliğini korumuştur ve ortaya çıkarılamayan konuları ile popüler bir araştırma konusu olarak kabul edilme özelliğini günümüzde de korumaktadır. Bu noktadaki en önemli bilinmeyen noktaların pubertenin başlangıcını tetikleyen faktörlerin neler olduğu, nasıl aktive oldukları, olası diğer mekanizmalarla olan ortaklıkları ve klinikte tedavi yaklaşımlarında kullanılıp kullanılmayacakları konularındaki boşluklar üzerinde olduğu görülmektedir ki bu konulardan biri de kisspeptinlerdir (Plant, 2015).

2.2. Hipotalamus ve Glutamaterjik Sistem

Beyinde GABA, omirilikte glisin hedef nöronlar üzerinde hiperpolarizasyon etkileri ile birer fren gibi inhibitör etki göstererek çalışırken, glutamat ve aspartat postsinaptik olarak hedef nöronları üzerinde tam ters bir etki ile hızlandırıcı bir pedal görevi üstlenmektedirler. Norepinefrin ve serotonin gibi nörotransmitterler beyinde özelleşmiş alanlarda bazı hücrelerde bulunurlarken, glutamat beyinde yaygın olarak bulunan eksitator bir transmitter olarak karşımıza çıkmaktadır. Glutamat kadar prekürsörü olan glutamin de beyin ve omirilik alanlarında yüksek konsantrasyonlardadır. Beyinden çıkan uyarıların taşındığı efferent sistem nöronlarının çoğunlukla glutamat üzerinden işlev gördüğü görülmektedir (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2015). Kortikostriatal, talamik, bulbar ve pontin yollar bunlar arasındadır ve bunlara ek olarak serebellumun mossy afferentleri

ve olfaktor loba'daki yollar da glutamat kullanılmaktadırlar. Beyinde glutamat yoğunluğunun katekolaminlerden 1000 kat daha fazla olduğu düşünülmektedir. Glutamaterjik sistem kendi başına merkezi sinir sisteminin major uyarıcı ve sürükleyici yolları ve bağlantıları olarak tanımlanabilir. Glutamat antagonistlerinin, örneğin ketaminin ve fenilsiklidinin aynı zamanda anestezi ilaçları olmaları yanında, bu tür etkilerin sonucunda ortaya çıkan glutamaterjik sistemin etkinliğinin azalması durumundaki farmakolojik ilişkiler ve bağlantılar net değildir. Glutamaterjik sistemde aktivite artışının ise şiddetli uyarılma ve nörotoksositeye neden olduğu bilinmektedir. Başlıca uyarıcıları olarak da quisqualic acid, ibotenic acid ve kainik asit sayılabilir (Purves, 2004). Glutamat analogu olan kainik asit, düşük dozlarında glutamat gibi etkinlik gösterebilmektedir ancak yüksek dozlarında nörotoksiktir ve bölgedeki nöronları hasara uğrattırırken aksonları etkilemediği bilinmektedir. Deniz yosunlarında doğal olarak bulunan bu glutamat agonisti nörotoksik olmasının yanı sıra epileptojeniktir. Bu özellikleri dolayısıyla Alzheimer ve epilepsi modellerinde kullanılmaktadır. İnhibitör bir sistem olarak GABA ve eksitator bir sistem olarak glutamaterjik sistem, merkezi sinir sistemin iki farklı ve zıt rolünü üstlenirken, pek çok sinir sistemi bölümü arasında, tüm bu bölümlerin içindeki yaygınlıkları dolayısıyla merkezi çoğu nöronal fonksiyonda birbirleri ile ilişki halinde çalışmaktadırlar. Glutamat ile alakalı olan merkezi yolların ayrıca ilişkide bulundukları alanlar açısından uzun aksonal projeksiyonları oldukları da bilinmektedir. Glutamat aynı zamanda GABA non prekürsörüdür (yani, biri diğerinden doğrudan sentezlenemez) ancak bir inhibitör nörotransmitter olan GABA glutamattan glutamate decarboxylase enzimi yardımı ile katalizlenebilmektedir. Bu enzimin de serebellum ve pankreasta yüksek yoğunluklarda olduğu bilinmektedir. Ancak, glutamatın GABA'ya dönüştürülmesi sınırlı bir süreçtir ve beyindeki GABA seviyeleri, glutamatın varlığına bağlı değildir (Johnson, 1985; Kandel ve ark., 2015).

Giriş bölümünde kısaca değinildiği gibi, glutamat reseptörleri G-protein ilişkili metabotropik reseptörler ve transmitter-kapılı iyon kanalları grupları altında iki farklı grupta sınıflandırılmaktadır. Postsinaptik glutamat-kapılı iyon kanalları pozitif yüklü iyonların postsinaptik alana geçmesine izin veren kanallar olarak AMPA ve NMDA reseptörleri olarak ayrılmaktadırlar. Çoğu sinapta AMPA ve NMDA reseptörlerinin

kolokalize oldukları da bilinmektedir. Glutamaterjik sinaps ilk oluşmaya başladığında postsinaptik membranda sadece NMDA reseptörleri görülmeye başlar. Bu tür yüksek oranlı ve koordine uyaranlar gerektiren sinapslar sessiz sinapslar olarak da adlandırılır. Glutamat reseptörlerinden glutamat-kapılı olanları seçici agonistleri dikkate alınarak AMPA, NMDA olarak ayrılırken daha özel dağılım gösteren kainik asit reseptörleri de üçüncü iyonotropik glutamat reseptörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Sayılan bu üç farklı reseptör de ligand olarak glutamatın fonksiyon gösterdiği glutamat-kapılı iyon kanallarıdır. AMPA ve NMDA beyinde hızlı eksitator sinaptik iletilerden sorumlularken, kainik asit reseptörleri yine tüm beyinde görülüyor olsalar da fonksiyonları tam olarak anlaşılabilmiş değildir. AMPA ve kainik asit reseptörleri Na^+ ve K^+ iyonlarına geçirgendirler; ama çoğu Ca^{++} 'a karşı geçirgen değildir. Aktivasyonları ile negatif membran potansiyeli ortaya çıkmakta ve Na^+ iyonlarının hücreye geçişi gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda da hızlı ve etkili bir depolarizasyon meydana gelmektedir. AMPA ve kainik asit reseptörleri quisqualate ve kainik asit tarafından uyarılabilirler. NMDA kanalları da Na^+ 'un geçişine imkan vererek eksitasyona neden olurlar ancak AMPA reseptörlerinden farklı olarak Ca^{++} 'a geçirgendirler ve voltaj bağımlıdır. Diğer iki reseptör tipine göre de daha yavaşlardır. NMDA reseptör kanalları açıldığında Ca^{++} ve Na^+ hücreye girmekte, K^+ hücreden çıkmaktadır ve bu geçişler postsinaptik membran potansiyeli ile ilişki içerisinde olmaktadır. Glutamat NMDA reseptörüne bağlandığında reseptör geçişe izin vermektedir ancak normal negatif dinlenme potansiyelinde kanal Mg^{++} tarafından bloklanmakta ve magnezyum bloğu diğer iyonların kanaldan geçişini önlemektedir. Mg^{++} 'un kanalı serbestleştirilmesi ancak membran depolarize olduğunda gerçekleşmektedir ki bu da komşu AMPA kanallarının aynı ve komşu sinapslarda aktive olması ile mümkün olmaktadır. NMDA reseptörlerindeki Mg^{++} bağlama kapasitesi ve bunun iyon geçişini engellemesi ayırd edici önemli bir özelliktir. Bu yüzden NMDA kanalları nörotransmitter kapıları olmalarının yanı sıra voltaj bağımlı kapılar olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Glutamat ve depolarizasyonun kanala aynı zamanda etki etmesi gerekmektedir (Johnson, 1985). NMDA reseptörleri tüm beyinde bulunmalarına karşın hipokampus ve kortekste daha yoğundurlar. NMDA reseptörüne sahip tüm hücrelerin sinaptik plastisitede önemli roller almaları da dikkat çekicidir. AMPA reseptörü de NMDA reseptörüne paralellik gösterecek şekilde bir dağılım

gösterirken kainik asit reseptörleri özellikle hipokampus gibi daha özelleşmiş alanlarda bulunmaktadır. Metabotropik glutamat reseptörü ise inositol tri fosfat ile ilişkili olarak ikincil haberci kullanan bir G-protein ile ilişkili reseptör olarak bilinmektedir ve gelişimsel plastisitede önemli roller alabileceği düşünülmektedir (Clements, Swapna, & Morikawa, 2013). Glutamat sinaptik plastisitedeki yukarıda anılan rolleri dolayısıyla öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonlar ile de ilişkilidir (McEntee, & Crook, 1993). Glutamat taşıyıcıları hem nöronal hem de glial membranlarda bulunmakta ve sinaptik aralıktaki fazla glutamati geri almaktadırlar. Glutamat reseptörlerindeki hiperaktivite ile fazla Ca^{++} 'un hücre içine girmesi ise nörotoksositeye yol açabilmektedir. Glutamat eksitotoksitesisi olarak adlandırılan bu durumda hücre içinde aşırı derecede artan Ca^{++} ile birlikte hücre içi enzimler aktive olmakta hücre membranı, hücre iskeleti ve DNA parçalanmasına kadar gidebilmektedir. Pek çok merkezi sinir sistemi hastalığı ya da travmasının da bu duruma yol açabildiği bilinmektedir (Manev, Favaron, Guidotti, & Costa, 1989; Shigeri, Seal, & Shimamoto, 2004).

NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olmalarının yanı sıra az oranda aspartat ile de aktive olmaktadır (Chen ve ark., 2005). Ayrıca NMDA reseptör aktivasyonu için, bir ko-aktivatör olan ve reseptörün bir parçası olan glisin de gerekli olduğu ve ondan daha da potent olarak D-serin'in glial kökenli bir ko-aktivatör olarak NMDA reseptör regülasyonuna katıldığı bilinmektedir (Wolosker, 2006). NR1 (GluN1), NR2A-D (GluN2A-D) ve NR3A-B (GluN3A-B) olarak alt gruplara ayrılan NMDA reseptörlerinden NR2B (GluN2B) postnatal dönemde baskın iken NR2A (GluN2A) gelişim ile birlikte gittikçe artmakta erişkin zamanda NR2B'den (GluN2B) daha baskın halde gözükmetedirler. Bilinen NMDA antagonistleri olarak; ketamine, amantadine, phencyclidine, nitrous oxide, memantine, dextromethorphan, dextrophan, riluzole, ethanol, xenon, HU-211, tramadol, ketobemidone, methadone, dextropropoxyphene, kratom alkaloidleri ve ibogaine sıralanabilir. MK-801 olarak bilinen "dizocilpin" de yarışmasız bir NMDA reseptör antagonistidir. NMDA reseptörünün iyon kanalına bağlanmakta ve bu bağlanma Ca^{++} da dahil olmak üzere iyonların geçişinin engellenmesi ile sonuçlanmaktadır (Foster, & Fagg, 1987). MK-801 ayrıca bir nikotinik asetilkolin reseptör antagonisti gibi çalışmakta ve serotonin ve

dopamin taşıyıcılarına bağlanarak inhibe etmektedir (Clarke & Reuben, 1995; Iravani, Muscat, & Kruk 1999).

Diğer iki iyonotropik glutamat reseptörlerinden daha az anlaşılmış olan kainik asit reseptörleri non-NMDA glutamat reseptörü olarak da AMPA ile birlikte anılmaktadır. Kainik asit reseptörlerinin beş farklı alt grubu tanımlanmıştır ve bunlar: “GluR5” (“GRIK 1”, “GluK1”), “GluR6” (“GRIK-2”, “GluK2”), “GluR7” (“GRIK-3”, “GluK3”), “KA1” (“GRIK-4”, “GluK4”) ve “KA2” (“GRIK-5”, “GluK5”) olarak kodlanmaktadır (Dingledine, Borges, Bowi, & Traynelis, 1999; Dingledine, 2012).

Daha önce kısaca değinildiği gibi iyon geçirici bir kanal olarak kainik asit reseptörlerinin özellikleri AMPA reseptörlerine benzeseler de kanal açılma hızları AMPA kanallarından çok daha kısa sürelidir. Kısa süreli olan tepkiselliği yanında uzun süren etkisi ve tekrarlayan uyarılan aditif özellikler göstermesi nedeniyle, kainik asit reseptörleri için, sinaptik sinyal iletiminden daha çok sinaptik plastisite ile ilişkilidirler denilebilmektedir (Mayer, 2005; Schmitz, Mellor, & Nicoll, 2001).

Merkezi sinir sistemindeki ana eksitatör nöromodülatör olan glutamatın, pek çok türde, GnRH nöronlarının uyarılması yolu ile LH salınımını ortaya çıkardığı da bilinmektedir. Glutamat analoglarının sıçanlarda ve maymunlarda LH salınımını arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca NMDA agonistlerinden d-cycloserin de LH düzeyini arttırmaktadır (Jayasena, Dhillon, & Bloom, 2009). NMDA’nın başlıca etki alanının GnRH nöronlarının yoğun olarak bulunduğu preoptik alanda olmasına rağmen, kainik asit ve AMPA, GnRH sinir terminallerinin yer aldığı medyan eminens ve arkuat çekirdek bölgelerinde aktivite göstermektedirler. NMDA’nın ayrıca *locus coeruleus* alanındaki noradrenerjik nöronlar üzerinden de GnRH aktivitesini etkileyebileceği de bilinmektedir (Brann, 1995). Sıçanlarda lateral hipotalamusa NMDA, AMPA ya da kainik asit mikroyenjeksiyonu ile yeme güdüsünün arttığı bildirilmiştir. Ayrıca yine lateral hipotalamusa NMDA reseptör antagonisti D(-)-2-amino-5-fosfonopentatonik asit verilmesi ile NMDA ile indüklenen iştah artışının engellendiği de bilinmektedir. Bu yüzden NMDA reseptör aktivasyonunun normal yeme davranışlarında fonksiyon

gösterdiği bilinmektedir (Briggs, Hannapel, Ramesh, & Parent, 2021; Stanley, Willett, Donias, Dee, & Duva, 1996).

2.3. Kisspeptinler

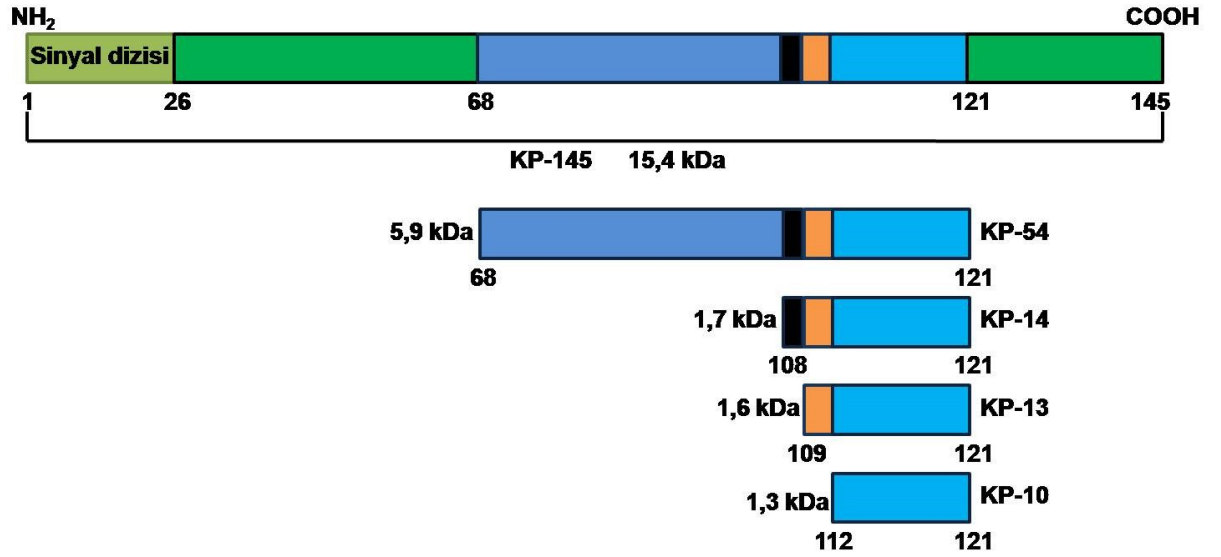
Günümüzde, kisspeptinlerin bilinen hipotalamik rolleri ve etkileri sonucunda GnRH aktivitesinin artması ile birlikte, pubertenin başlangıcındaki bir tetikleyici mekanizmanın önemli parçalarından biri olduğuna inanılmaktadır (Dhillon, 2008; Jayasena ve ark., 2011; Seminara ve ark., 2003; Seminara, & Crowley, 2008). Pubertenin başlangıcı kadar organizmanın üreme ile ilgili döngülere hazırlanması ve mevsimsel üreme davranışları gibi konular da, kisspeptinler ile birlikte, karşımıza çıkan yeni hipotezler oluşturmaktadır (Clarke, & Caraty, 2013).

Kisspeptinler, “Kiss1” olarak bilinen bir gen ile transkript edilen bir ön proteinden türemektedir. HHG aksını etkileyerek fertilite ve pubertede oldukça önemli roller üstlenmektedirler. Ayrıca kesilme noktaları açısından farklı aminoasit uzunluklarındaki peptitler ailesi olarak bilinmektedirler (Colledge, 2004). İlişkili oldukları “Kiss1r” reseptörleri, insanlarda ve yakın memelilerde üremenin fonksiyonel olarak kazanılması sırasında gelişen değişimler, “kisspeptin–Kiss1r” sisteminin üreme gibi fonksiyonları yöneten merkezlerdeki olası rollerinin ortaya çıkarılması gibi konular açısından ilgi çekmektedirler. Fonksiyonları üzerine olan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Nöronal salınımları açısından üzerinde çalışılan memeli hayvan türleri arasında birbirlerinden farklı histolojik dağılım bölgeleri, birer nöropeptit olarak aralarındaki değişen etkinlik oranları, türler arasındaki yine değişen etkinlik mekanizmaları literatürde tartışılmaktadır ve konu hakkındaki bilgi birikimine eklenmeye devam eden önemli noktalar olarak göze çarpmaktadırlar. Genel bir bakış ile, “Kiss1” geni tarafından kodlanan kisspeptinlerin, insanlar da dahil olmak üzere tüm memeli türlerinde gonadotropin salınımının güçlü uyaranları olduklarını görmekteyiz (Colledge, 2004). Her iki cinste de ön hipofizden salgılanan iki önemli gonadotropik hormonun özel olarak normal seksüel gelişme ve fonksiyonlarından sorumlu olduğu bilinmektedir: LH ve FSH (Bear, Connors, & Paradiso, 2015). Kisspeptinlerin gonadotropinlerin salınımları üzerindeki etkileri ise ön hipofiz

üzerinde etkiye bulunan GnRH üzerinden olmaktadır. Ayrıca kisspeptinler tarafından gerçekleştirilen gonadotropin düzeylerindeki bu artışın GnRH antagonistleri tarafından engellenebildiği de gösterilerek kisspeptinler ve hipotalamik GnRH arasındaki bağlantının aracısız olduğu da ortaya konulmuştur. GnRH nöronlarının büyük kısmı kisspeptinlere yönelik reseptör (Kiss1r) taşımaktadırlar ve bu reseptörün kaybında kisspeptinlere karşı bu hücrelerin duyarlılıkları kaybolmaktadır. Kisspeptin reseptörü açısından genetik bozuklukların infertilite ve hipogonadotropik hipogonadizm ile sonuçlandığı da bilinmektedir (Colledge, 2004).

Son yirmi yıllık literatür bilgileri ile birlikte, “Kiss1” geni tarafından kodlanan 145 aminoasit uzunluğundaki bir öncülden gelen ve “GPR54” reseptör sistemi ile etkilerini sağlayan peptitlerin kisspeptinler nöropeptid grubunu oluşturduklarını görmekteyiz (Gottsch ve ark., 2004; Gottsch, Clifton, & Steiner, 2009). Literatürde uzun bir dönem kisspeptin reseptörü karşılığı olarak kullanıldığı adıyla “GPR54” olarak bilinen reseptör, memeli beyin dokusunda geniş bir yaygınlıkta bulunan galanin reseptörleri ile yaklaşık %45 oranında bir benzerlik taşımaktadır. G proteinleri ile çalışan reseptörler ailesinin (GPCR) içerisinde yer almaktadır. Birden fazla beyin bölgesi yanında periferdeki diğer dokularda da bulunan “GPR54” reseptör sisteminin nasıl kodlandığı da 1999 yılında ortaya çıkarılmıştır (Lee ve ark., 1999). İlgili proteinlerin öncüllerinin üretilmesini sağlayan “Kiss-1” geni öncelikle insanlarda kültür ortamındaki “malign melanoma” hücrelerinde “tümör metastaz baskılayıcı” bir genetik bileşen olarak 1996 yılı ile birlikte izolasyonu yapılarak bildirilmiştir. Kisspeptin üyelerinden 54 sayıdaki aminoasiti içeren “kisspeptin 54”, melanoma ve meme kanserlerine ait kültürlerinde hücrelerin çoğalma potansiyelini azaltma özelliklerinden dolayı “metastin” olarak adlandırılmıştır (Lee ve ark., 1999). 2001 yılında ise üç ayrı araştırma merkezinde yapılan bağımsız araştırmalar ile takip eden dönemde “kisspeptin-54” adıyla bilinecek “metastin”in ilgili genin etkileri açısından bir aracı olduğu gösterilmiştir. Bu bulgulardan sonra da öksüz “orphan” reseptör olarak tanımlanması da son bulmuştur (Ohtaki ve ark., 2001; Kotani ve ark., 2001; Muir ve ark., 2001). İnsan türünde “GPR54” reseptörünün özellikle plasentada, hipofizde, pankreasta ve omurilikte yüksek oranlarda üretildiğinin görülmesinden dolayı endokrin etkileşimlerinin de olabileceği hipotez edilmiştir (Kotani ve ark., 2001). Metastazı baskılayan gen olarak

bilinen “Kiss1” geninin transkribe ettiği bu peptitler “C” terminallerinde herbirinde olan “RF-amid” “Arg-Phe-NH₂” dizisini taşımaktadırlar. “54”, “14”, “13” ve “10” aminoasitlik uzunluklarındaki bu protein ailesinin tümünün “GPR54” reseptörüne agonistlik yaptığı ve kisspeptinler adı altında toplandıkları daha önceden kabul edilmiş ve literatüre girmiştir (Kotani ve ark., 2001). Öncüllerinin üretilmesini sağlayan genin ilk bulunduğu bölgenin bir marka değeri ile “kisspeptinler” adlarını alan bu peptitler (“kisspeptin-54”, “kisspeptin-14”, “kisspeptin-13” ve “kisspeptin-10”) üreme, puberte, enerji metabolizması gibi pek çok konuda işlevsel olarak görev alan “RF amid peptitleri” ailesinin üyeleridirler. “C” terminal sonlanmalarında on aminoasit uzunluğundaki “kisspeptin-10” olarak isimlendirilen bir aminoasit sırası tümü için ortaktır. Terminolojik olarak da GPR54 reseptör agonisti olan nöropeptidler olarak tanımlanmaktadırlar (Şekil 1) (Dhillon, 2008; Kotani ve ark., 2001). “GPR54 reseptörü” adı yanında artık “Kiss1r” “Kisspeptin reseptörü” adının kullanımı da literatüre girmiştir.



Şekil 1: Kisspeptin prekürsörü KP-145 ve karboksi terminal parçasından oluşan kisspeptin-54 (metastin), kisspeptin-14, 13 ve 10 (Kafa, & Eyigör, 2011).

Etki güçleri açısından bakıldığında, doğal olarak oluşan ve en güçlü reseptör etkisi yaratan kisspeptinin “kisspeptin-10” olmasına yönelik olarak pek çok bildirim olsa da farklı kisspeptin üyelerinin etki güçlerinin farklı hayvan türlerinde değişken etki güçleri gösterdiği de yapılan çalışmalarda görülebilmektedir (Kotani ve ark., 2001; Ohtaki ve ark., 2001). Ayrıca, kemiricilerde metastin’in in vivo olarak yukarıda

belirttiğimiz kisspeptinlerden daha fazla güçlü etki gösterebileceği de bildirilmiştir (Thompson ve ark., 2006). Farklı kisspeptin parçacıkların aynı türlerde ya da kisspeptinlerin farklı türlerde eş etki gücünde olmadıklarını söylemek daha tutarlı gibi gözükmemektedir.

Literatürde kisspeptinlerin etki ettiği kisspeptin reseptörü üzerine pek çok farklı adlandırma getirildiği görülmektedir. AXOR12, hOT7T175, GPR54, KISS1R, KISS1 ve metastin reseptör bunlardan en sık kullanılanlarından bazılarıdır (Gottsch ve ark., 2009). Ayrıca gen, mRNA ve protein olarak tanımlamalarında (terminolojisinde) ve türlere yönelik betimlemelerde de karışıklıklar ortaya çıkmaya başlamıştır. Kisspeptin terimi, “Kiss1” geninin ürünleri için kullanılması gerektiği düşünülmekte, ayrıca metastin’in de sadece kisspeptin-54’ü niteliyor olması gerektiği tartışılmaktadır. Aynı zamanda *metastin* terminolojisinin sadece kanser biyolojisinde kullanılmasının gerekliliği de öne çıkmaktadır. “KISS1” terimi insan kisspeptin kodlayıcı genini belirtirken, büyük harfle başlayıp küçük harflerle devam edecek olan “Kiss1” insan dışı türlerdeki kisspeptin genini temsil etmesi gerekliliği de *Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee* tarafından önerilmiştir. Gen sembollerinin italik hale getirilip (*Kiss1*) protein ürünlerinden bu şekilde ayrılması da yine önerileri arasındadır (Gottsch ve ark., 2009). KISS1R ve Kiss1r aynı zamanda reseptör proteini için de sırasıyla insan ve insan dışı türlere yönelik olarak kullanılabilecektir (Gottsch ve ark., 2004; Gottsch ve ark., 2009; Kotani ve ark., 2001).

Kisspeptinlere karşılık gelen terimler kullanılırken literatürde kisspeptin-54 ya da kisspeptin-10 terimleri kullanılabildiği gibi 145 aa’lık öncüde ki amino asit pozisyonlarına göre de tanımlanabilmektedirler. Örneğin, kisspeptin 68-121 ve kisspeptin 112-121 sırasıyla kisspeptin-54 ve kisspeptin-10’a karşılık gelebilmektedir. Terimler kısaltılarak Kp-54 ya da Kp-10 olarak da kullanılabilmektedir. Bu noktada KP-10 insan türü için, kp-10 ise insan dışı türler için kullanılması önerilmektedir. Pek çok veritabanında kisspeptin reseptörünün karşılığı olarak “GPR54” terimi verilmiş olduğu, ancak bu durumun da değişmekte olduğu görülmektedir. Örneğin “*Mouse Genome Informatics*” veritabanı 2001-2006 yıllarında GPR54’ü reseptör karşılığı

olarak tanımlarken daha sonradan bu “Kiss1r” ile değiştirilmiştir (Gottsch ve ark., 2004; Gottsch ve ark., 2009; Kotani ve ark., 2001).

2.3.1. KISS1R Sistemi, Hipotalamus ve GnRH

Kisspeptinlerin ekspresyonlarının ve ilgili ekspresyonları sağlayan nöronların fonksiyonlarının anlaşılabilmesine yönelik olarak, daha önceki araştırmaların ışığı altında, kisspeptinlerin ve etkileşimde oldukları reseptörlerinin meydana getirdikleri fonksiyonların, diğer sistemler ve diğer hipotalamus alanlarındaki nöronlar ile olan ilişkilerinin bilinmesi önemlidir. Kisspeptinlerin tüm aile üyeleri ile birlikte “GPR54” reseptör sistemi ile olan moleküler etkileşimleri “kisspeptin-GPR54” sistemi olarak adlandırılmaktadır. İlgili sistem dâhilindeki kisspeptin-immünoreaktivitesi gösteren nöronlar bağlantıda oldukları bölgeler ile birlikte, üremenin fonksiyonel yönünde ve pubertenin başlangıç sürecinde önemli roller üstlendikleri düşünülmektedir (Dhillon, 2008; Plant, 2006).

“GPR54” reseptörünün fonksiyonlarını kaybetmesine neden olan mutasyonel durumların insanlarda ve kemiricilerde puberte ile ilişkili gelişimsel süreçlerde durma ve cinsel aktivite kaybı ile birlikte “hipogonadotropik-hipogonadizm” durumu ile sonuçlandığı bilinmektedir. “GPR54”ın puberte ile birlikte fizyolojik GnRH aktiviteleri için en önemli unsur olarak gören araştırmalar “kisspeptin-GPR54” sisteminin bu fonksiyonlara yönelik etkilerini anlamamız yolunda önemli adımlar atmışlardır (Cerrato ve ark., 2006; Roux ve ark., 2003; Seminara ve ark., 2003). 2003 yılında iki bağımsız grup tarafından ortaya çıkarılan bulgular ile kisspeptinler ve reseptörleri üreme biyologlarının ilgisini üzerlerine çekmiştir. Birbirlerinden kısa süre aralar ile hastalarında “Kiss1r” mutasyonları ile birlikte pubertel gelişimde gecikme ve “hipotalamik-hipogonadizm” tanımlamışlardır. Tek bir reseptör mutasyonu ile pubertenin etkilenmesi, puberteyi tetikleyen faktörleri anlamamız için önemli bir nokta olabileceği gündeme gelmiştir (Gottsch ve ark., 2009). Ayrıca “GPR54” reseptörünü etkileyen ve farklı düzeylerde “hipotalamik-hipogonadizm”, pubertede bütünüyle durma, kısmen/tamamlanmamış puberte ile sonuçlanan yediden fazla mutasyonel durum “kisspeptin-GPR54” sistemini de etkileyebilmektedir (Chan,

Broder-Fingert, & Seminara, 2009). “GPR54”ü etkileyen mutasyonel durumlar ile cinsel gelişme süreçlerini, üremeyi ve fertilizasyonu etkileyecek olan fenotip de dahil olmak üzere ortaya çıkan bozukluklar, “kisspeptin-GPR54” sisteminin GnRH nöronlarının aktif olduğu, fetal dönem, yenidoğan, puberte ve erişkinlik süreçlerinin tümünde aktif olduğunu düşündürmektedir (Chan ve ark., 2009). “GPR54-/-” yani “GPR54” geni homozigot delesyona uğratılmış olan kemiricilerde küçük testisler ve folikülerde matürasyon yokluğu ile vaginada fonksiyonel bozukluklar gösterilmiştir (Seminara ve ark., 2003). Ek olarak, yukarıda bahsi geçen ve kisspeptinlerin fonksiyonlarını etkileyecek olan ve hücre içi uyarılardaki uzayan aktivite durumuna neden olan “GPR54”teki mutasyonel bozukluklar merkezi puberte prekoksya yol açmaktadır (Teles ve ark., 2008). “GPR54-/-” kemiricilerde hipogonadik durum görülmesine karşın, GnRH nöronlarında morfolojik bozukluk gösterilmemesi ve bu nöronların projeksiyonlarının median eminense hala devam etmesi, hipotalamo-hipofizer-gonadal aksta GnRH nöronlarından daha önceki mekanizmaların devreye girdiğini göstermektedir (Messenger ve ark., 2005). “GPR54” reseptörleri ile kolokalizasyon gösteren hipotalamik GnRH nöronlarında bu reseptörlere ligandlık yapan kisspeptinler, GnRH nöronlarını direkt olarak etkileyebilmekte ve periferik yolla kisspeptin verilmesi GPR54 mutasyonlu farelerde LH ve FSH salınımına yol açmamaktadır. “GPR54-/-” kemiricilerde, normal GnRH nöronları yanında, reseptör-ligand ilişkisinin reseptör yönünden engellenmesi sonucunda pubertenin ortaya çıkışının etkilendiğini gösteren çalışmalar, kisspeptin-GPR54 sisteminin üreme fonksiyonlarının gelişimindeki önemli başlatıcı ve uyarıcı etkilerine de ışık tutmaktadır (Messenger ve ark., 2005). Kisspeptinin, “GnRH” aracılığı ile “LH” ve “FSH” düzeylerinde artış oluşturduğu “GPR54” mutasyonel durumlu kemiricilerde rapor edilmiş ve dışarıdan metastin verilmesi ile her iki cinsten gonotropik düzeylerde artış, puberte öncesi dişilerde ise ovulasyon görüldüğü bildirilmiştir (Matsui ve ark., 2004; Navarro ve ark., 2005). Bu etkinin GnRH antagonistleri ile engellenebilmesi de önemli bir bulgudur (Matsui ve ark., 2004). Primat türlerinde kisspeptin tedavisi ile “GnRH” ve “LH” düzeylerinde “GnRH antagonistleri” ile eski haline dönebilen artış gösterilmiştir. Ayrıca yine primat türlerinde “GPR54-mRNA” düzeylerinin puberte öncesi süreçte, “Kiss-1-mRNA” düzeylerinin de puberte ile birlikte artış gösterdiği bildirilmiştir (Shahab ve ark., 2005).

GnRH salınımı yapan nöronların dağılımlarının, farklı memeli türlerinde farklı biçimlerde karşımıza çıktığını bilmekteyiz (Herbison, 2006). Kisspeptin nöronları ile GnRH nöronları arasındaki fonksiyonel ya da anatomik ilişkiler üzerine olan çalışmaların bu farklılıkları dikkate almaları gerekmektedir (Colledge, 2009). Sıçanlarda (Matsui ve ark., 2004), farelerde (Messenger ve ark., 2005), koyunlarda (Caraty ve ark., 2007) ve primatlarda (Seminara, Dipietro, Ramaswamy, Crowley, & Plant, 2006) olduğu gibi insanlarda hem erkek hem kadınlarda kisspeptin verilmesinin hipotalamik fonksiyonları etkilediği ve gonadotropin düzeylerini arttırdığı bilinmektedir (Jayasena ve ark., 2008). Kisspeptin fragmanları arasında en fazla amino asit dizisine sahip olan kisspeptin-54 ün intravenöz infüzyonu ile erkeklerde plazma LH seviyelerinde iki kat, FSH da %18 ve testosteron seviyelerinde %13'lük artış gözlenirken "kisspeptin-54"ün kadınlarda derialtı enjeksiyonu ile LH da 7 kat daha fazla ve preovulatar fazda daha belirgin olmak üzere hem LH hem de FSH düzeylerinde artma gözlemlenmiştir (Jayasena ve ark., 2008).

Kisspeptin nöronlarının GnRH nöronlarına olan etkileri ve bu etkinin mekanizmaları, "GPR54" reseptörünün GnRH nöronlarındaki ko-lokalizasyonlarının ortaya çıkarılması ve ileri araştırmalar ile tartışabileceği gibi bu konu da ek bazı noktaların da orta çıktığını görmekteyiz. Farelerde, medio bazal hipotalamik eksplant kültürlerinde kisspeptin uyarımı ile GnRH salınımı olduğu ve tetradoksin ile bu kisspeptin bağımlı GnRH salınımının değişmediği gösterilmiştir. Tetradoksin potent bir voltaj kapılı Na^{++} kanal blokeri olarak eminentia mediana'ya projekte olan GnRH nöronlarındaki aksiyon potansiyellerini engelleyeceğinden, kisspeptinlerin direkt olarak mediobazal hipotalamustaki GnRH sinir terminallerine etkili olabileceğinin de göz önünde bulundurulması gerektiği bildirilmiştir (d'Anglemont de Tassigny ve ark., 2008).

Ovarian siklusun foliküler fazında artan östrojen seviyelerinin hipofiz kaynaklı ve ovulasyondan sorumlu olan LH salınımına neden olacak şekilde hipotalamustan GnRH salınımını artırdığı bilinmektedir. Östrojenin GnRH nöronları üzerindeki pozitif geribildiriminin anteroventral periventriküler, median preoptik ve

periventriküler preoptik nükleuslarda bulunan ve östrojen alfa reseptörü (ER α) eksprese eden nöronlar aracılığı ile dolaylı yoldan olduğu da düşünülmektedir. GnRH nöronları ile ilişkide olan bu nöronların kisspeptin de dahil olmak üzere glutamat, GABA ve nörotensin salınımında bulundukları gösterilmiştir (Herbison, 2008). Bulgular artıka hipotalamik kisspeptin nöron topluluklarının rol dağılımlarındaki önemli bir noktanın da östrojen bağımlı GnRH ve LH salınımlarının düzenlenmesi olduğu ortaya çıkmıştır (Franceschini, Lomet, Cateau, Delsol, Tillet, & Caraty, 2006). ER α üzerinden yapılan çalışmalar, kemiricilerde arkuat nükleustaki kisspeptin nöron topluluklarının GnRH salınımında negatif geribildirim rolü üstlendiklerini, antero ventral periventriküler nükleustaki kisspeptin nöronlarının ise pozitif geribildirimde görev yaptığını düşündürmektedir (Smith, Acohido, Clifton, & Steiner, 2006). Koyunlarda da arkuat nükleus kaudalindeki kisspeptin nöronlarının hemen hemen tamamının ve preoptik alandakilerin yarısının değişen yoğunluklarda ER α taşıdıkları gösterilmiştir (Franceschini ve ark., 2006). Farklı türlerde yapılan çalışmalar ile kisspeptin nöronlarının ayrıca seks steroidlerine duyarlı oldukları görülmektedir. Kastrasyon ya da overektomi ile primatlar ve kemiricilerin arkuat nükleuslarında kisspeptin ekspresyonu artmakta, kemiricilerde AVPV’de azalma görülmekte, koyunlarda da overektomi ile arkuat nükleusta ekspresyon artışı izlenmektedir (Dhillon, 2008).

Hipotalamik diğer fonksiyonlar açısından bakıldığında, Suriye Hamsterları ile yapılan çalışmalar mevsimsel üreme ve kisspeptinler arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmış ve gün ışığının azaldığı mevsimsel değişikliklerin arkuat nükleusta “Kiss-1 mRNA” seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Bu kisspeptin inhibisyon, pinealektomi ile önlenilmekte ve direkt ya da indirekt yollardan melatonin aracılığı ile olduğu da düşünülmektedir (Simonneaux, Ansel, Revel, Klosen, Pévet, & Mikkelsen, 2009). “Kisspeptin-GPR54” sistemi üzerinde mevsimsel üreme konusunda melatonin etkileri olduğu gibi üremenin metabolik düzenlenmesi konusunda da leptinin etkileri tartışılmaktadır. Kastrasyon yapılmış erkek farelerde yapılmış bir çalışmada, kisspeptin eksprese eden nöronların yaklaşık yarısında leptin reseptörlerinin de lokalize olması kisspeptin nöronlarının leptinin direkt hedeflerinden biri olduğunu ve bu nöronların üremenin metabolik düzenlenmesinde rol alabileceklerini

düşündürmektedir (Smith ve ark., 2006). Leptin yetersizliği olan ob/ob mutasyonlu farelerde iştah engellenememekte ve obezite meydana gelmektedir. Bu farelerde normal genetik yapıdaki farelere göre arkuat nükleuslarında “Kiss-1 mRNA” düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. Yine bu azalmanın leptin tedavisi ile normalin altında kalacak şekilde düzeldiği gözlemlenmiştir (Smith ve ark., 2006). Koyunlarda da arkuat nükleus ve preoptik alandaki kisspeptin nöronlarında leptin reseptörleri bulunmakta ve leptin ile etkileşmektedirler. Kisspeptin verilmesi ile enerji balansında rol aldıkları bilinen nöropeptit-Y’nin gen ekspresyonu artmakta ve pro-opiomelanocortin’in gen ekspresyonu azalmaktadır (Backholer ve ark., 2010). Üremeyi etkileyen farklı bir yol olarak, enerji dengesi, adipoz doku fonksiyonları ve iştah gibi metabolik konularla kisspeptin nöronları arasındaki ilişkiler üzerine olan araştırmalar gün geçtikçe artmakta ve dikkat çekmektedir.

2.3.2. Kisspeptin Nöronlarının Hipotalamik Dağılımları

Farklı memeli türlerinde kisspeptin nöronlarının beyin bölgelerindeki dağılımları, haritalama çalışmaları ve diğer nöropeptid, hormon ve mediatörler ile olan ko-lokalizasyonları halen üzerinde çalışılmakta olan konulardan biridir. Kendi çalışmalarımızda, kisspeptin nöronlarının sıçan beyinlerindeki normal dağılımları incelenmiş ve AVPV’de, preoptik periventriküler ve arkuat çekirdeklerde kisspeptin immunoreaktivitesi olan hücre toplulukları tanımlanmıştır. Bulgularımız, kisspeptin nöronlarının sıçanlarda AVPV’nin dağınık ve diğer hipotalamik alanlara göre en az sayıda immunoreaktif hücre gövdesi içerdiğini, anterior arkuat çekirdeğin yine az sayıda, medial arkuat çekirdeğin ise orta düzeyde nöron gövdesi sayısı içerdiğini göstermiştir. Rostral alanlarda akson yoğunluğunun yüksek olduğu görülmüştür. Posterior arkuat çekirdekte ise çok sayıda işaretli nöron gövdesi bulurken, akson yoğunluğunun daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıntıları bulgular bölümünde verilen bilgiler yanında diğer çalışmalara bakıldığında, kisspeptin immünoreaktivitesi gösteren nöronların fare beyninde, hipotalamik yerleşimli oldukları, yoğun bir periventriküler devamlılık gösterecek şekilde 3. ventrikülün rostral kısmında, arkuat çekirdekte ve daha az yoğunluktaki dağınık hücre grupları halinde dorsomedial

hipotalamik çekirdek ve posterior hipotalamusta bulundukları gösterilmiştir (Clarkson, d'Anglemont de Tassigny, Colledge, Caraty, & Herbison, 2009). Kisspeptin nöronlarına ait sinir uzantılarının da yine kemiricilerde lateral septumun ventral bölümünde, hipotalamusun periventriküler bölgelerinde, retrokiazmatik yolların ventralinde bulundukları, ayrıca stria terminalisin bed nükleusu, subfornikal organ, medial amigdala, paraventriküler hipotalamus, periakvaduktal gri cevher ve *locus ceruleus*'ta da yoğunlaştıkları bildirilmektedir (Clarkson ve ark., 2009; Gottsch ve ark., 2004). Koyunlarda yapılan çalışmalara bakıldığında, kisspeptin nöronlarının arkuat çekirdek kaudalinde, dorsomedial hipotalamik çekirdekte ve medial preoptik alanda yoğunlaştıkları görülmektedir (Franceschini ve ark., 2006). Arkuat çekirdek kaudalindeki kisspeptin nöronlarının, bu memeli türünde periovulatuvar olarak up-regüle oldukları bildirilmiştir (Smith, Li, Pereira, & Clarke, 2009). Pompolo ve ark. diğer türlerden farklı olarak koyunlarda preoptik alanda, GnRH hücreleri ile kisspeptin ko-lokalizasyonu göstermişlerdir (Pompolo, Pereira, Estrada, & Clarke, 2006). Atlarda da, kisspeptin nöronlarının özellikle arkuat çekirdekte, çekirdeğin orta kısımlarından recessus premamilleris'e doğru uzanacak şekilde dağılımları tanımlanmış ve kisspeptin immunoreaktivitesi gösteren nöronal uzantıların, genişlemiş görünümlü boyanma özellikleri taşıdıkları ve preoptik alandan mamillar çekirdeklere doğru uzandıkları, yoğunluklarının ise periventriküler alanda ve median eminente yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (Decourt, Tillet, Caraty, Franceschini, & Briant, 2008). Atlarda kisspeptin ve GnRH nöronlarına ait sinir uzantılarının arasındaki ilişkinin median eminente fazla, anterior bazal periventriküler alanda daha az olduğu belirtilmiştir (Decourt ve ark., 2008). Primatlarda da arkuat çekirdekte kisspeptin nöronları tanımlanmıştır (Shahab ve ark., 2005); ancak primatlarda şimdiye kadarki çalışmalara bakıldığında AVPV yerleşimli kisspeptin nöronları konusunda fazla bilgi bulunmamaktadır (Rometo, Krajewski, Voytko, & Rance, 2007). İnsanlardaki dağılım ve lokalizasyon bilgilerinin ise ancak yakın memeli türleri üzerinde yapılacak çalışmalar ile bir miktar aydınlatılabileceği aşikardır. Medial hipotalamik yapılarla birlikte lateral septal beyin bölgelerinin bu üç ana kisspeptin nöron alanı tarafından (AVPV, PVN ve arkuat nükleus) innerve edildikleri düşünülmekle birlikte bu projeksiyonların fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (Clarkson ve ark., 2009).

Farklı türlerde ve farklı antikorlar ile yapılan çalışmalarda kisspeptin nöronlarının dağılım alanları Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 1: Farklı türlerde ve farklı antikorlar ile yapılan çalışmalarda kisspeptin nöronlarının dağılım alanları. (Kısaltmalar: KP, kisspeptin; IHK, immünohistokimya; ISH, insitu hibridizasyon; RT-PCR, reverse transcriptase polymerase chain reaction; WB, western blot; Arc, arkuat çekirdek; DM, dorsomedial hipotalamik çekirdek; RP3V, rostral periventriküler alan; PH, posterior hipotalamus; AVPV, anteroventral periventriküler çekirdek; PeN, Periventriküler çekirdek; POA, preoptik alan; BnST, stria terminalisin bed çekirdeği; VMH, ventromedial çekirdek; LRt, lateral retiküler çekirdek; CVL, caudoventrolateral retiküler çekirdek; Sol, nükleus traktus solitarius; SP5, spinal trigeminas traktus; RVL, rostroventrolateral retiküler çekirdek) (Kafa, & Eyigör, 2011).

Tür-Cins	Teknik	İşaretleyici	Kisspeptin nöron pozitifliği görülen alanlar
At-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 566) (KP 43-52)	Arc, (DM)
Fare-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 566) (KP 43-52)	RP3V, Arc, DM, PH
Fare-dişi	ISH		Arc, AVPV, PVN, (POA, amigdala, BnST)
Hamster-erkek	IHK	Tavşan anti insan (KP 4-13) (T-4771-Peninsula Lab. Inc.)	Arc, AVPV, DM
Hamster-erkek	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 564)	Arc
Hamster-erkek	ISH		Arc
Koyun-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC 566) (KP 43-52)	AVPV, Arc, POA, DM
Koyun-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti fare KP-10 (AC) (KP 43-52)	Arc, POA
Koyun-dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	POA, PVN, Arc, (DM, VMH)
Siçan-dişi	IHK	Monoklonal anti siçan metastin (KP 1-52) (No:254)	Arc
Siçan-erkek/dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	DM, LRt, Arc, PVN, VMH, CVL, Sol, Sp5
Siçan-erkek/dişi	RT-PCR		Hipotalamus, beyin sapı, medulla spinalis, serebral korteks
Siçan-erkek/dişi	WB	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	Hipotalamus, beyin sapı, medulla spinalis
Siçan-erkek/dişi	IHK	Poliklonal tavşan anti insan KP-10 (KP 45-54) (Phoenix Pharmaceuticals-Inc.)	Sol, CVL, (RVL, medulla spinalis)
Siçan-erkek/dişi	IHK	Anti fare KP	Arc, AVPV
Siçan-erkek/dişi	ISH		AVPV, Arc

Farklı memeli türlerinin hipotalamuslarında kisspeptin nöronlarının yoğunlaştıkları çekirdeklerin ve alanların, aynı zamanda nöronal uzantılarının yoğunluklarının tespit edilme ve tanımlanma farklılıkları ya da bazı çalışmalarda tanımlanamamaları ile ilgili sorunların, kullanılan işaretleme metodlarının duyarlılıkları ve ayrıca kullanılan antikorların karakteristiklerinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı konusu tartışılmaktadır. Örnek olarak Brailoiu ve ark.’nın sıçanlardaki çalışmalarında (Brailoiu ve ark., 2005) preoptik dorsal hipotalamus dışında ön hipotalamus alanlarında kisspeptin immünoreaktivitesini gösterememiş olmaları, çalışmalarında kullanılan antikorun insan metastin peptitinin 45-54 parçasına yönelik olması ve çalışma düzeninde kullanılan deney hayvanı türüne özgül

olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Clarkson ve ark., 2009). Daha özgül antikörlerin kullanımı ile üstesinden gelinebilen bu gibi etkenlerin ötesinde, tür farklılıklarının yanı sıra cins farklılıkları da dikkate alınmalıdır. Yine örnek olarak, kemiricilerde AVPV bölgesinde cinsiyete bağlı farklı kisspeptin dağılımı olduğu bilinmektedir (Adachi ve ark., 2007; Clarkson, & Herbison 2006). Kisspeptin nöronları AVPV’de dişilerde daha fazla oranda bulunmakta ve testosteron verilmesi ile perinatal olarak erkeklerle aralarındaki bu farklılık azalabilmektedir. AVPV’deki kisspeptin nöron topluluğunun ana rollerinden birinin dişilerde prenatal olarak gonadal steroidlerce organize edilerek erişkin yaşama taşınan preovulatuvar GnRH/LH dalgasının oluşumuna yönelik olduğu düşünülmektedir (Kauffman ve ark., 2007).

2.4. Oreksin Nöronları

Oreksinler iki farklı araştırma grubu tarafından 1998 yılında tanımlanan ve farklı teknik yaklaşımlarla varlıkları gösterilen peptitlerdir. Moleküler biyoloji teknikleriyle Lecea ve ark., hipotalamusta eksprese edilen bir grup cDNA izolasyonu yapmışlar ve bunların serebellum ya da hipokampusta var olmadıklarını hibridizasyon tekniği ile göstermişlerdir (De Lecea ve ark., 1998). Bu grup yeni izole ettikleri proteinin 130 amino asit içerdiğini ve iki farklı peptide kesildiğini belirlemiş ve hipotalamusta eksprese edilmesiyle sekretin peptidine benzemesi nedeniyle hipokretin olarak isimlendirmişlerdir. Aynı yıl içerisinde iki peptidin identifiye edildiği ve bu peptitlerin iki farklı G-protein-bağlı reseptörün ligandı olduğu da bildirilmiştir (Sakurai ve ark., 1998). Bu peptitler hipotalamusun beslenme merkezi olarak bilinen lateral hipotalamusta yerleşik nöronlarca sentezlenmesi nedeniyle, Yunanca “açlık” anlamına gelen “orexis” kelimesine atfen oreksinler olarak isimlendirilmiştir. Böylece oreksinler ilk olarak besin alınımlarını tetikleyici rolleriyle önem kazanmıştır (Meister, 2007; Willie, Chemelli, Sinton, & Yanagisawa, 2001)

Oreksinlerin tanımlanmasından hemen sonra oreksin/hipokretin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayan iki çalışma yayınlanmıştır. Bu çalışmalardan ilkinde oreksin reseptörlerindeki bir mutasyonun, köpeklerde görülen narkolepside rol oynadığı gösterilmiştir (Lin ve ark., 1999). Bilindiği üzere narkolepsi artmış gündüz

uyku hali ve prematür REM uykusuna geçişler ile karakterize bir nörolojik hastalıktır. Aynı ay içinde prepro-oreksin geni silinmiş transgenik farelerde, insandaki narkolepsi-katapleksiye taklit eden bir fenotipin görüldüğü rapor edilmiştir (Chemelli ve ark., 1999). Takip eden çalışmalar oreksinlerin bu nörolojik hastalıktaki kesin etkilerini belirlemiştir.

Daha sonraki çalışmalarda oreksinlerin uyanıklığın devamı, kognitif, kardiyovasküler ve nöroendokrin fonksiyonlardaki etkileriyle daha geniş bir fonksiyonel alanda yer aldıkları belirlenmiştir (Stenberg, 2007). Oreksinlerin merkezi veya sistemik uygulamalarıyla yapılan araştırmalar, çok sayıdaki farmakolojik etkilerini göstermesi açısından önemlidir. İntraserebroventriküler uygulanması deneklerde besin alımını arttırmaktadır ve enerji dengesinin düzenlenmesinde oreksin nöronları nöropeptid Y ve melanosit uyarıcı hormon nöronlarıyla entegre olarak etki göstermektedirler (Horvath, Andrews, & Diano, 2009). Sempatik ve kardiyovasküler uyarıcı etkileri açısından farklı bir alanda da oreksin çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Oreksinlerin hipotalamik hipofizer adrenal (HPA) aksındaki etkileri çok sayıda araştırmaya konu olmuş ve aldesteron, glukokortikoid ve katekolamin sekresyonunu düzenleyici etkileri gösterilmiştir. Diğer nöroendokrin sistemler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda ise büyüme hormonu, kortikotropin salıverici hormon ve prolaktin üzerine etkileri belirlenmiştir (Spinazzi, Andreis, Rossi, & Nussdorfer, 2006).

Oreksin peptitleri bilinen iki G-protein-bağlı reseptöre bağlanarak etkilerini göstermektedirler (Marcus, & Elmquist, 2006). Oreksin-1 (“OX1R”) ve oreksin-2 (“OX2R”) olarak isimlendirilen bu reseptörlerin dağılımı genel olarak akson dağılım alanlarına uygunluk göstermektedir. Reseptörlerin yerleşimi in situ hibridizasyon deneyleriyle mRNA düzeyinde (Marcus, 2001) ve immünohistokimya tekniği ile protein düzeyinde (Cluderay, Harrison, & Hervieu, 2002) gösterilmiştir.

Çok sayıda önemli işlevleri olan oreksin nöronlarının afferent innervasyonları hakkında bilinenler hala sınırlıdır. Hangi nöronların oreksin nöronlarına yöneldiği, hangi transmitterlerin bu nöronlardan salıverildiği ve oreksin nöronlarının bu

uyaranlara nasıl cevap verdiklerinin bilinmesi önemlidir. Farklı nörotransmitter veya nöromodülatör sistemlerin oreksin nöronları üzerinde etkili olduğu ve bu nöronların regülasyonunda önemli oldukları bildirilmiştir (Yamanaka, 2006). GABAerjik ve dopaminerjik inhibitör etkilerin yanında noradrenerjik, kolinerjik ve glutamaterjik eksitator etkili innervasyonun varlığı, farklı teknik yaklaşımlarla gösterilmiştir. GABAerjik düzenlenimin varlığı, GABA agonistleri muscimol ve baklofenin elektrofizyolojik olarak oreksin nöronlarını hiperpolarize ettiğinin belirlenmesi (Xie, 2006), GABAerjik afferentlerin gösterilmesi ve veziküler GABA taşıyıcılarının oreksin nöronlarına temas eden sinaptik oluşumlarda varılmasıyla anlaşılmıştır (Henny, & Jones, 2006). Dopaminin transsinaptik olarak oreksin nöronlarını regüle ettiği, serotoninerjik nöronların oreksin nöronlarını inerve ettiği ve noradrenalin, asetil kolin ve histamin nörotransmisyonunun oreksin nöronlarının eksitator düzenleniminde rol aldıklarının belirlendiği az sayıda çalışma mevcuttur (Yamanaka, 2006).

2.5. Vazopressin Nöronları

Vazopressin (arjinin vazopressin, AVP olarak da bilinir) oksitosinle beraber nörohipofizin esas hormonlarını oluşturmaktadırlar. Nöropeptit özelliği taşıyan her iki hormon da hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerinde sentezlenir ve nörohipofizde sonlanan akson terminallerinden dolaşıma katılırlar. Peptitler yapısal olarak birbirlerine çok benzerler ve sadece iki amino asit pozisyonunda değişiklik göstermektedirler (von Bohlen und Halbach, & Dermietzel, 2006). Vazopressin geni klonlanmış ve dizilimi de belirlenmiştir. Vazopressin, proressorfinin adı verilen 166 amino asitlik bir öncü proteinin kesilmesi sonucu oluşur. Bu kesilme sonucunda ayrıca nörofizin II adı verilen ve spesifik olarak vazopressinin taşıyıcı proteini olan parça da oluşur ve vazopressin nörofizinle beraber salgı granülleri içinde akson sonlarına taşınmaktadır (Gainer, & Wray, 1992).

Vazopressin hipotalamik SON ve PVN bölgelerinde yerleşik magnosellüler nöronlarda sentezlenir. Bu nöronların aksonları hipotalamo hipofizer traktus içerisinde nörohipofize yönelir ve uygun uyaranla buradan kan dolaşımına salıverilir. Vazopressin içeren nöronlar oksitosin nöronlarıyla aynı hipotalamik çekirdeklerde

yerleşik olmasına rağmen, aynı nöronda kolokalize olmazlar, diğer bir deyişle her hormona özgül tek bir nöron vardır. Vazopressin nöronları ayrıca SCN’de de yerleşiktirler. Hipotalamik çekirdekler dışında vazopressinerjik nöronlara bed nükleusta, amigdalanın medial çekirdeğinde ve *locus coeruleus* alanında rastlanır (von Bohlen und Halbach, & Dermietzel, 2006). Nörohipofize yönelen vazopressinerjik aksonların yanısıra merkezi sinir sisteminin farklı noktalarında vazopressinerjik efferentlere rastlanır. Magnosellüler nöronların aksonları median eminens ve nörohipofize geçerek hormonal etkiyle vücutta su tutulumu ve ACTH salınımının kontrolü üzerine etkilerini gösterirler. Vazopressini nöromodülatör olarak kullanan paraventriküler parvosellüler nöronlar, arka beyine ve medulla spinalise projekte olarak kalp hızı ve kan basıncı gibi otonomik fonksiyonları düzenlerler. SCN’nin vazopressin nöronları, 3. ventrikül çevresine aksonlar göndererek muhtemelen sirkadian fonksiyonları etkilerler. Ekstrahipotalamik vazopressin nöron gruplarından stria terminalisin bed nükleusunda yer alanlar lateral septum, habenular çekirdek gibi ön beyin alanlarına, dorsal raphe çekirdeği, ponsun peripedinkular çekirdeği ve *locus coeruleus* alanına yöneldikleri bilinmektedir (De Vries, & Miller 1998).

Vazopressin sentezi ve sekresyonu, artan plazma osmolaritesi, azalan kan basıncı ve hipovolemi ile uyarılmaktadırlar (Cunningham, & Sawchenko, 1991). Bu sistemik değişimler, farklı nörotransmitter, nöromodülatör maddeler ve hormonlar aracılığı ile vazopressin nöronlarının fonksiyonel olarak modülasyonunda etkili olurlar. Vazopressin nöronlarının düzenleniminde rol alan en önemli nörotransmitterler olarak adrenalin, noradrenalin, dopamin, GABA ve glutamat sayılabilir. Glutamaterjik innervasyon ayrıca supraoptik magnosellüler nöronlarda da gösterilmiştir. Magnosellüler nöronların glutamaterjik afferentleri, sinir sisteminin farklı alanlarında yerleşiktir ve hem SON hem de PVN üzerine etkili olmaktadır (Csaki, Kocsis, Kiss, & Halasz, 2002). Farklı glutamat reseptörlerinin bu hipotalamik bölgelerde yer alan nöronlarca eksprese edildiği in situ hibridizasyon çalışmaları ile mRNA düzeyinde gösterilmiştir (Eyigör, Centers, & Jennes, 2001). Metabotropik glutamat reseptörlerinin yanında çoğu çalışma konusu iyonotropik reseptörler üzerine olmuştur. NMDA reseptörlerinin tüm beş alt biriminin de vazopressin nöronlarında ekspresyonu hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde belirlenmiştir (Pak, &

Curras-Collazo, 2002). AMPA reseptörleri ile ilgili raporlarda karışıklıklar göze çarpmaktadır. Örnek olarak dört alt birimin de az miktarda eksprese olduğunu bildiren yayınlar varken, bir insitu hibridizasyon çalışmada GluR2 ve GluR3'ün az miktarda, GluR1'in orta düzeyde ve GluR4'ün ise çok miktarda eksprese olduğu da bildirilmiştir (Van Den Pol,, Hermans-Borgmeyer, Hofer, Ghosh, & Heinemann, 1994). Literatürde SON'de kainik asit reseptörü eksprese eden nöronlarının varlığını araştıran çalışma sayısı ise oldukça azdır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışmalarımız kapsamında glutamat agonistlerinin kisspeptin, vazopressin ve oreksin nöronları üzerindeki aktivasyon etkileri ve kisspeptin nöronlarında glutamat reseptörlerinin ekspresyonları histolojik yaklaşımlarla araştırılmıştır. Glutamatın, NMDA ve non-NMDA reseptörlerine ait agonistlerinden AMPA ve kainik asitin (ve antagonistlerinin) periferik intraperitoneal (IP) olarak uygulanmasını takiben çalışmamıza dâhil edilen nöron popülasyonları c-Fos ekspresyonu ve glutamat reseptörleri açısından değerlendirilmiştir. İmmunohistokimyasal olarak belirlenen c-Fos proteinin varlığı nöronal aktivasyon işaretleyicisi olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan primer antikorların bilgileri Tablo 2’de, sekonder antikorlar, diğer kimyasallar, agonist ve antagonistlerin bilgileri de metod bölümleri alt başlıklarında verilmiştir. Kisspeptin nöronlarının sıçan beynindeki özellikle dağılımları ve aksonlarının yoğunluğu da immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Çalışmalarda kullanılan protokoller ilgili Etik Kurul Kararı: 19.04.2005/1, Tarih 19.04.2005. no ve tarihi ile onaylanmıştır. Çalışmalarda, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na ait laboratuvarların malzeme ve gereç olanakları ile birlikte, mevcut bulunan kimyasallar ve işaretleyiciler kullanılmıştır. İmmunohistokimya tekniklerinde gerekli olan kisspeptin antikorunu Dr. Alain Caraty tarafından hibe edilmiştir. Gereksinim duyulan diğer antikorlar açısından laboratuvarımızda mevcut olanları kullanılmıştır.

Tablo 2: Kullanılan Primer Antikor Bilgileri

Antikor	Firma, Kod	Dilüsyonu (IF)	İnkübasyon
Tavşan anti-c-Fos	Calbiocem, PC-38	1:20000	Tüm gece
Tavşan anti-[Arg-8]-vazopressin	Peninsula, T-4463	1:5000	24 saat
Keçi anti-orexin A (C-19)	Santa Cruz, sc-8070	1:2000	Tüm gece
Tavşan anti-kisspeptin	Dr. Alain Caraty	1:10000 (1:5000)	48 saat
Kobay anti-VGlu2	Chemicon, AB5907	1:5000	Tüm gece
Kobay anti-VGlu3	Chemicon, AB5421	1:5000	Tüm gece
Keçi anti-GluR1 (GluA1)	Santa Cruz Biotechnology, SC7608	1:100	72 saat
Fare anti-GluR2 (GluA2)	Chemicon, MAB397	1:500	72 saat
Fare anti-NMDAR1 (GluN1)	Chemicon, MAB363	1:50	72 saat

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplar

Deneylerde 60-90 günlük, 250–300 gr ağırlığında Sprague–Dawley cinsi erişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Denekler normal nöronal dağılım çalışmaları dışında üç ana deney grubuna dağıtılmıştır: Kainik asit grubu, AMPA grubu ve NMDA grubu. Her ana grupta üç alt grup oluşturulmuştur: Kontrol grubu (serum fizyolojik grubu), agonist grubu (Kainik asit, AMPA ya da NMDA) ve antagonist grubu (6–cyano–7–nitroquinoxaline-2,3-dione [CNQX] ya da MK-801 grubu). Tüm agonist ve antagonistler ile serum fizyolojik periferik olarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla deneklere uygulandı. Enjeksiyonlar saat 10:00-11:00 arasında yapıldı. Antagonist gruplarında, antagonist enjeksiyonlarından 15 dk sonra agonist enjeksiyonu yapıldı. Oluşturulan deney grupları ve uygulanan biyolojik aktif kimyasalların (serum fizyolojik, agonist ve antagonistlerin) dozları ve uygulama miktarları Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 3: Deney grupları

Gruplar	Alt Gruplar*	Biyolojik Aktif Madde***	Doz
Kainik Asit Grubu	Kontrol	Serum Fizyolojik (SF)	300 µl/denek
	Agonist	Kainik Asit (Calbiochem, LA)	2,5 mg/kg/300 µl/denek
	Antagonist **	CNQX (Ascent Scientific North Somerset, UK)	1 mg/kg/300 µl/denek
AMPA Grubu	Kontrol	Serum Fizyolojik (SF)	750 µl/denek
	Agonist	AMPA (Ascent Scientific North Somerset, UK)	5 mg/kg/750 µl/denek
	Antagonist **	CNQX (Ascent Scientific North Somerset, UK)	1 mg/kg/750 µl/denek
NMDA Grubu	Kontrol	Serum Fizyolojik (SF)	2 ml/denek
	Agonist	NMDA (Ascent Scientific North Somerset, UK)	100 mg/kg/2 ml/denek
	Antagonist **	MK-801 (Ascent Scientific North Somerset, UK)	1 mg/kg/300 µl/denek

* Her bir alt grup için n=7

** Bu gruplarda antagonist uygulamasından 15 dk sonra belirtilen dozda agonist enjeksiyonu yapılmıştır.

*** Tüm enjeksiyonlar 10⁰⁰-11⁰⁰ arası intraperitoneal yapılmıştır.

Son enjeksiyonlardan 90 dk. sonra tüm denekler derin eter anestezisi altında 0,13 M Sorenson'un fosfat tamponda hazırlanan %4 paraformaldehit (PFA) ile transkardiyak perfüzyon fiksasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Bu yöntemde deney hayvanlarının göğüs kafesleri açılarak, kateter kalp apeksinden aortaya yerleştirilmiş ve sabitlenmiştir. Damar içi basınca uygun ayarlanan perfüzyon pompası yardımıyla, öncelikle deneklerin dolaşım sistemleri %0,9 NaCl (150 ml) ile temizlenmiş, sonra denek başına 400 ml fiksatif ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Perfüzyon sonrası çıkarılarak aynı fiksatifte +4°C'de gece boyu post-fiksasyon uygulanan beyinlerden vibratom ile 50 µm'lik koronal kesitler alınmıştır. Hipotalamusun rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde alınan kesitler 5 seri halinde Tris-HCl tampon solüsyonu (pH 7.6) içine toplanmış ve Tris-HCl solüsyonunda yıkanıp fiksatiften arındırılarak kriyoprotektan madde içinde -20°C'de saklanmıştır.

Hücre tiplerinin belirlenmesi ve aktive nöronların gösterilmesi amacı ile ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca kesitlere, ilgili nöron tiplerinde eksprese edilen iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerinin belirlenmesi için ikili immüno Floresans ve ikili indirekt immünoperoksidaz teknikleri uygulanmıştır.

Hipotalamik çekirdeklerde ilgili peptitleri eksprese eden nöronların ve aktivasyonlarının belirlenmesi, ayrıca bu nöron gruplarının glutamaterjik innervasyon aldığı gösterilmesi amacıyla aşağıda ayrıntıları verilen ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi uygulanmıştır. c-Fos proteinin çekirdekteki immüno-pozitifliği nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanılmıştır.

3.2. Oreksin, Vazopressin ya da Kisspeptin Nöronlarında Aktivasyonun Gösterilmesi

- Kriyoprotektandan arındırma: Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkama.
- Non-spesifik bağlanmanın bloklanması: Kesitlerin oda sıcaklığında %10 normal at serumunda 2 saat inkübasyon.
- Primer antikor uygulaması: Tavşan anti c-Fos antikor (1:20000) ile kesitlerin oda sıcaklığında tüm gece inkübasyon.
- Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkama.
- Sekonder antikor uygulaması: Eşek anti tavşan IgG ile (1:300) 2 saat, oda sıcaklığında inkübasyon.
- Avidin-Biotin-Kompleks (ABC) uygulaması: Uygulamadan 30 dk önce üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan solüsyonda kesitlerin oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonu.
- Substrat-kromojen solüsyonu uygulaması: Oluşan immüno kompleksin ışık mikroskopik olarak görünür hale getirilmesi için oda sıcaklığında 5 dk nikel DAB (3,3' - Diaminobenzidine) solüsyonu ile inkübasyon.
- c-Fos ekspresyonunun görülebilir hale getirilmesinin ardından, hangi hücre tiplerinin c-Fos immüno reaktivitesi gösterdiğini belirlemek amacıyla kesitler oreksin, vazopressin ya da kisspeptin için bir kez daha yüzen kesit immünohistokimyası ile işaretlendi:
 - Non-spesifik bağlanmanın bloklanması: Kesitlerin oda sıcaklığında %10 normal at serumunda 2 saat inkübasyon.
 - Primer antikor inkübasyonu: anti-vasopressin (1:5000, 24 saat), anti-oreksin (1:2000, 24 saat) ya da anti-kisspeptin (1:10000, 72 saat) ile oda sıcaklığında.
 - Sekonder antikor inkübasyonu: Uygun sekonder antikor (Jackson Immuno Research Laboratories) ile oda sıcaklığında 1:300 dilüsyonda 2 saat.
 - ABC inkübasyonu: 1 saat, oda sıcaklığında.
 - Substrat-kromojen solüsyonu uygulaması: 5 dakika, oda sıcaklığında DAB solüsyonunda inkübasyon. (Kromojen solüsyonu, 100 ml Tris-HCl tamponunda, 50 mg DAB ve 5 µl hidrojen peroksit eklenerek hazırlandı)
 - Kurutma ve DPX ile kapatma.

3.3. Oreksin ve Vazopressin Nöronlarında Veziküler Glutamat Taşıyıcıları (VGluT2, VGluT3) için İmmunoperoksidaz Boyaması

- Kriyoprotektandan arındırma: Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkama.
- Non-spesifik bağlanmanın bloklanması: Kesitlerin oda sıcaklığında %10 normal at serumunda 2 saat inkübasyon.
- Primer antikor uygulaması: Kesitler, primer antikor solüsyonlarında Tablo 2’de verilen dilüsyon ve sürelerde inkübasyon.
- İkincil antikor uygulaması: Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkama, kullanılan primer antikoru tanıyan ve biotin konjuge sekonder antikorlar ile (1:100 – 1:200; Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, PA) ile 2 saat inkübasyon.
- Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkama.
- Avidin biyotin kompleksi (ABC Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA) solüsyonu ile 1 saat inkübasyon.
- Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkama.
- Substrat kromojen solüsyonu (DAB) ile inkübasyon.
- Tris-HCl tamponu ile 3 x 10 dakika yıkama.
- Kesitleri lamlara alınıp kurutma ve DPX ile kapatma.

3.4. Kisspeptin Nöronlarında GluR1 (GluA1), GluR2 (GluA2) ve NMDAR1 (GluN1) Reseptör Alt Birim Proteinlerinin Ekspresyonunun Gösterilmesi

- Kriyoprotektandan arındırma: Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkama.
- Non-spesifik bağlanmanın bloklanması: Kesitlerin oda sıcaklığında %10 normal at serumunda 2 saat inkübasyon.
- Primer antikor uygulaması: Tavşan anti-kisspeptin antikoru ile reseptör alt birimlerinden birine ait antikoru karışımını içeren solüsyonda 72 saat inkübasyon yapıldı. Bu amaçla tavşan anti-kisspeptin (1:5000, Dr. Alain Caraty), keçi anti-GluR1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology), fare anti-GluR2 (1:500, Millipore), fare anti-NMDAR1 (1:50, Chemicon) antikorları belirtilen dilüsyonlarda kullanıldı.
- Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkama.

- Sekonder antikor uygulaması: Kesitler FITC işaretli eşek anti-tavşan IgG (1:100; Jackson Immuno Research Laboratories) ile birlikte TexasRed işaretli eşek anti-fare IgG (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories) ya da TexasRed işaretli eşek anti-keçi IgG (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories) karışımı ile 2 saat inkübasyon.
- Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkama.
- Lamlara alınarak kurutma ve Prolong® Antifade Kit (Molecular Probes, Oregon, USA) ile kapatma.

3.5. Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonlar

Sorenson'un Fosfat Tamponunun Hazırlanışı: Solüsyon A [$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,13 M), (Merck)] 46,54 g/lt, Solüsyon B [KH_2PO_4 (0,13 M), (Merck)] 17,68 g/lt. Her iki solüsyon buzdolabında saklandı. Solüsyon A üzerine solüsyon B eklenerek pH 7,4'e ayarlandı.

%4'lük Paraformaldehitin Hazırlanışı: 100 ml distile suda 20 g (%4'lük için 40 gr) paraformaldehit (Merck, Cat. No: 104005) magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı üzerinde 58°C 'ye kadar ısıtılarak çözüldü. Sıcaklık kesildi. Solüsyon berraklaşınca kadar 1 N NaOH (Merck) ilave edildi. Filtre kağıdından süzildikten sonra 0,13 M'lık fosfat tamponu ile 1 lt'ye tamamlandı. pH ölçümü yapılarak konsantre hidroklorik asit (HCl) ya da 1 N NaOH ile son pH 7,4'e ayarlandı.

Tris Tamponunun (0.05 M) Hazırlanışı: 6 gr Trizma base (Merck, Cat. No: 108387) 1000 ml distile suda çözündürüldü. Konsantre hidroklorik asit (HCl) ile pH 7,6'ya ayarlandı.

Kriyoprotektanin Hazırlanışı: 0,05 M Tris tamponu (500 ml), süktroz (BDH, Prod. No: 302997) (300 g), etilen glikol (BDH, Prod. No: 282966) (300 ml) ve polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22) (10 g) kullanıldı. Maddeler verilen sıraya göre eklendi. Karışım distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Bloklayıcı Serumun Hazırlanışı: İnaktif halde bulunan %10'luk normal at serumu 56°C'lik sıcak su banyosunda aktive edildi. %0,1 sodyum azid ve %0,2 triton-X 100 eklendikten sonra karışım Tris tamponu ile 1 lt'ye tamamlandı.

3.6. Hücre Sayımları ve İstatistiksel Analiz

Çalışmalar kapsamında yapılan tekli ve ikili işaretlemeler sonucu hazırlanan kesitlerin koordinatları Paxinos'un sıçan beyin atlasına (Paxinos, & Watson, 2006) göre belirlendi. SON için bregma -0.48 mm ile -1.44 mm, PVN için bregma -1.32 mm ile -1.92 mm, lateral hipotalamus için ise bregma -2.04 mm ile -3.60 mm koordinatları arasında seçildi. Bu aralıklarda rostrokaudal düzlemde hipotalamusun 5 farklı seviyesinden alınan kesitlerde sayım işlemleri yapıldı. Kesitlerin birbirine eşit uzaklıkta (lateral hipotalamusta 350 µm'lik aralıkla) ve her denek için aynı koordinatta olmasına dikkat edildi.

İmmunoperoksidaz boyaması yapılan kesitlerin incelemesi Olympus BX-50 fotomikroskopta, ikili immünofloresans yöntemle işaretlenen kesitlerin incelemesi ise Olympus BX-FLA Reflected Light Flourescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopta 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde anında tarama yapılarak gerçekleştirildi. Kurutularak kapatılan kesitlerde hücre sayımlarında 40x büyütme alanında ilgili nöron tiplerinin bulunduğu hipotalamik çekirdeklerdeki tüm hücreler değerlendirilmiş ve c-Fos aktivasyon düzeyleri yüzde olarak elde edilmiştir.

Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri olarak $p < 0.05$ alındı (SPSS ver.16.0).

İkili immünohistokimya boyamalarında tavşan anti-c-Fos antikoru çok düşük dilüsyonda bile mükemmel sonuç vermektedir. Çalışmalar kapsamında ikili çalışmalarda tavşanda üretilmiş diğer antikorlarla tür farkı olması için alınan koyun-

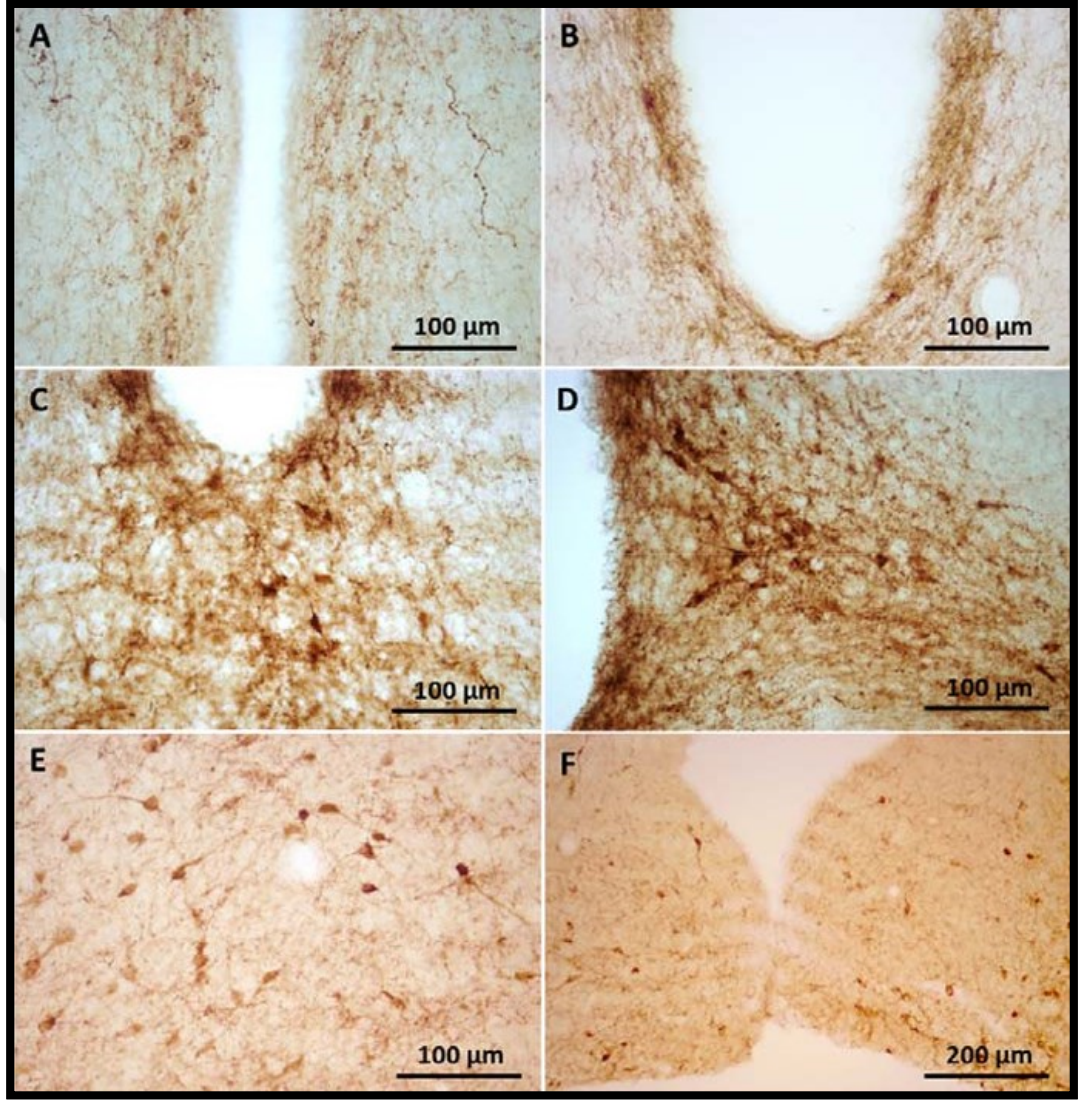
anti-c-Fos antikoruna spesifik olmayan boyanma göstermiştir. Bu nedenle çalışmaların tümünde tavşanda üretilen c-Fos antikoruna kullanılmıştır. Her ne kadar ikili boyamalarda aynı türde üretilmiş antikorların kullanılması önerilmese de, sadece çekirdeğe lokalize olan c-Fos ya da benzeri proteinlerle birlikte bir sitoplazmik protein araştırılıyorsa, teknikte aynı türde üretilmiş antikorların kullanımı bir sorun yaratmamaktadır. Çalışmalarımızda ilk aşamada boyanan c-Fos sadece çekirdekte lokalize immün reaksiyon vermiş ve sonrasında kullanılan ve sadece sitoplazmada boyama yapan nöroendokrin nöron antikorları, aynı türde üretilmiş olsalar da c-Fos reaksiyonundan hiçbir şekilde etkilenmemiştir.



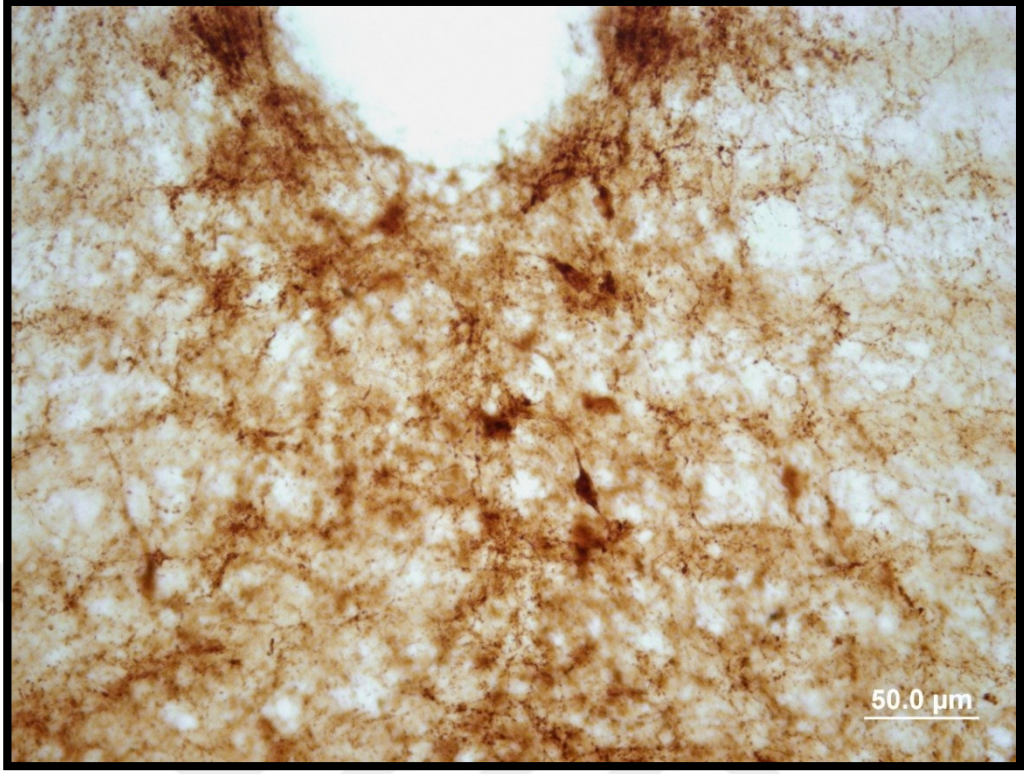
4. BULGULAR

4.1. Kisspeptin Nöronlarında Normal Dağılım ve Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İncelenmesi

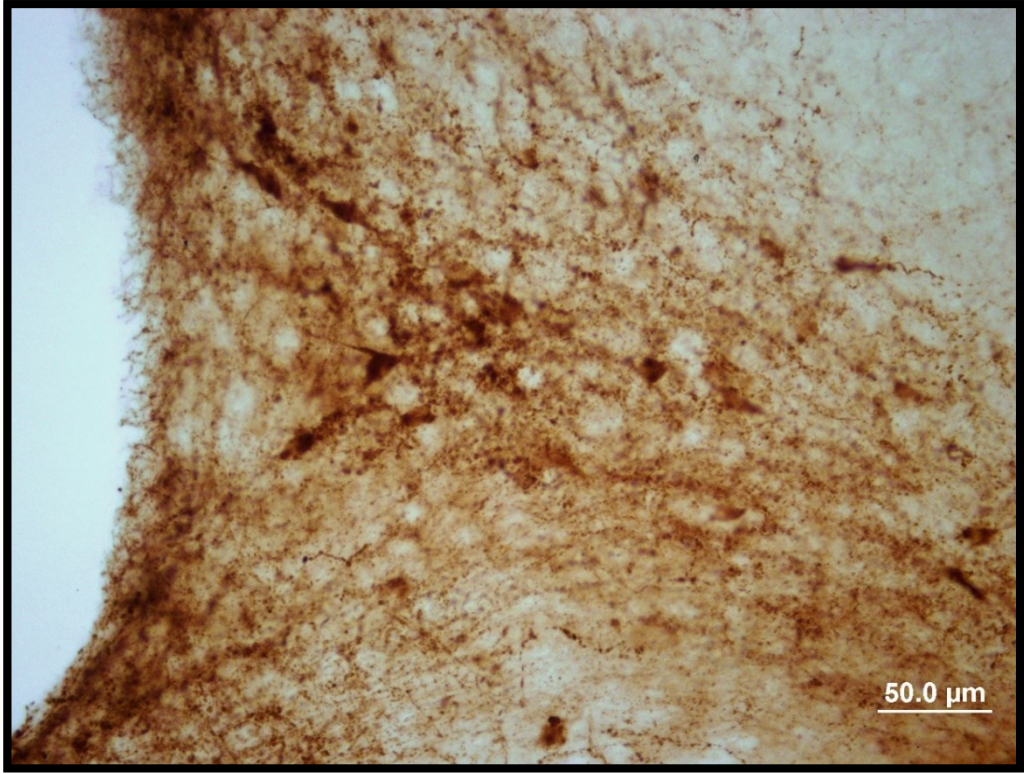
Tez çalışmalarımızda kisspeptinler açısından yaptığımız çalışmalarda ilk olarak ilgili proteini taşıyan nöronların sıçan merkezi sinir sistemindeki normal dağılımları incelenmiştir. Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz verilerin ilerideki çalışmalarımıza yön vereceğini de düşünmekteyiz. Kisspeptin nöronlarının sıçan beyinlerindeki AVPV’de, ayrıca preoptik periventriküler ve arkuat çekirdeklerde yoğunlaştıkları tespit edildi. Anterior arkuat çekirdekte az sayıda, medial arkuat çekirdekte orta düzeyde nöron gövdesi sayısı gözlenirken, bu alanlarda akson yoğunluğunun diğer beyin bölgelerine göre yüksek olduğu görüldü. Posterior arkuat çekirdek açısından bu bölgede ise çok sayıda işaretli nöron gövdesi bulunurken akson yoğunluğunun nispeten azaldığı tespit edildi. Akson yoğunluğu hipotalamik bölgeler açısından rostral olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. AVPV’deki dağılımın daha dağınık ve daha az sayıda olduğu da görülmüştür (Şekil 2-5).



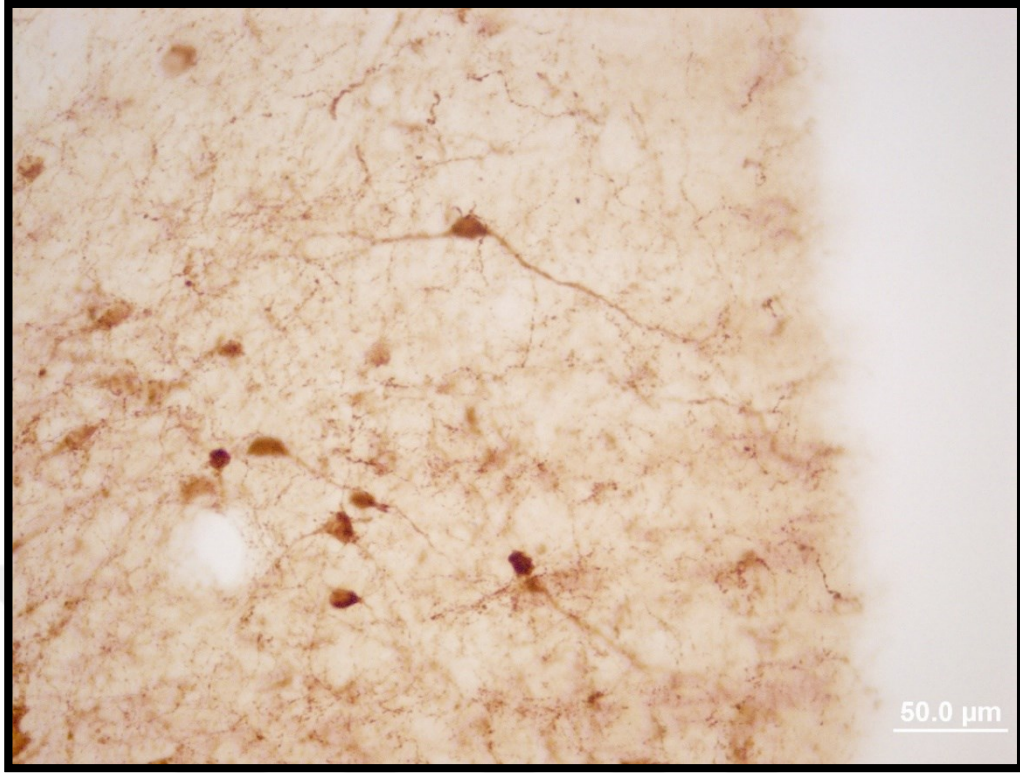
Şekil 2: Kisspeptin nöronlarının dağılım alanları (Kafa, & Eyigör, 2011). Kisspeptin nöron ve aksonlarının dişi sıçan hipotalamusundaki dağılımları. Anteroventral periventriküler çekirdekte (A) arkuat çekirdekten daha az oranda hücresel kisspeptin immünoreaktivitesi gözlemlenirken, preoptik periventriküler çekirdek düzeylerinde aksonal kisspeptin immünoreaktivitesi (B) yoğun olarak tespit edilmiştir. Anterior arkuat çekirdek (C) az sayıda, medial arkuat çekirdek (D) ise orta düzeyde nöron gövdesi sayısı içerirken posterior arkuat çekirdekte (E, F) ise çok sayıda işaretli nöron gövdesi görülmüştür. Rostral alanlarda akson yoğunluğu yüksek olarak izlenmiştir (Ölçek çubuğu 100 ve 200 (F) µm).



Şekil 3: Daha yüksek büyütme ile anterior arkuat çekirdek kisspeptin immünoreaktivitesi. Az sayıda hücre gövdesi görülürken aksonal yoğunluğun yüksek olduğu görülmekte (Ölçek çubuğu 50 μ m).



Şekil 4: Daha yüksek büyütme ile medial arkuat çekirdek kisspeptin immünoreaktivitesi. Anterior arkuat çekirdekte daha fazla sayıda hücre gövdesi görülürken, aksonal yoğunluğun yine yüksek olduğu görülmekte (Ölçek çubuğu 50 μ m).



Şekil 5: Daha yüksek büyütme ile posterior arkuat çekirdek kisspeptin immünoreaktivitesi. Anterior ve medial arkuat çekirdeklerden daha fazla sayıda hücre gövdesi görülürken aksonal yoğunluğunun çok daha azaldığı görülmekte (Ölçek çubuğu 50 μ m).

Çalışmalarımızda kisspeptin immünreaktivitesi gösteren nöronların AVPV, preoptik alan ve arkuat çekirdekte kontrol grubunda c-Fos aktivitesi göstermedikleri veya az gösterdikleri, AMPA verilmesi ile c-Fos aktivitelerinde anlamlı artış olduğu ve antagonisti olan CNQX verilmesi sonrasında anlamlı azalma olduğu tespit edildi (Şekil 6-8).

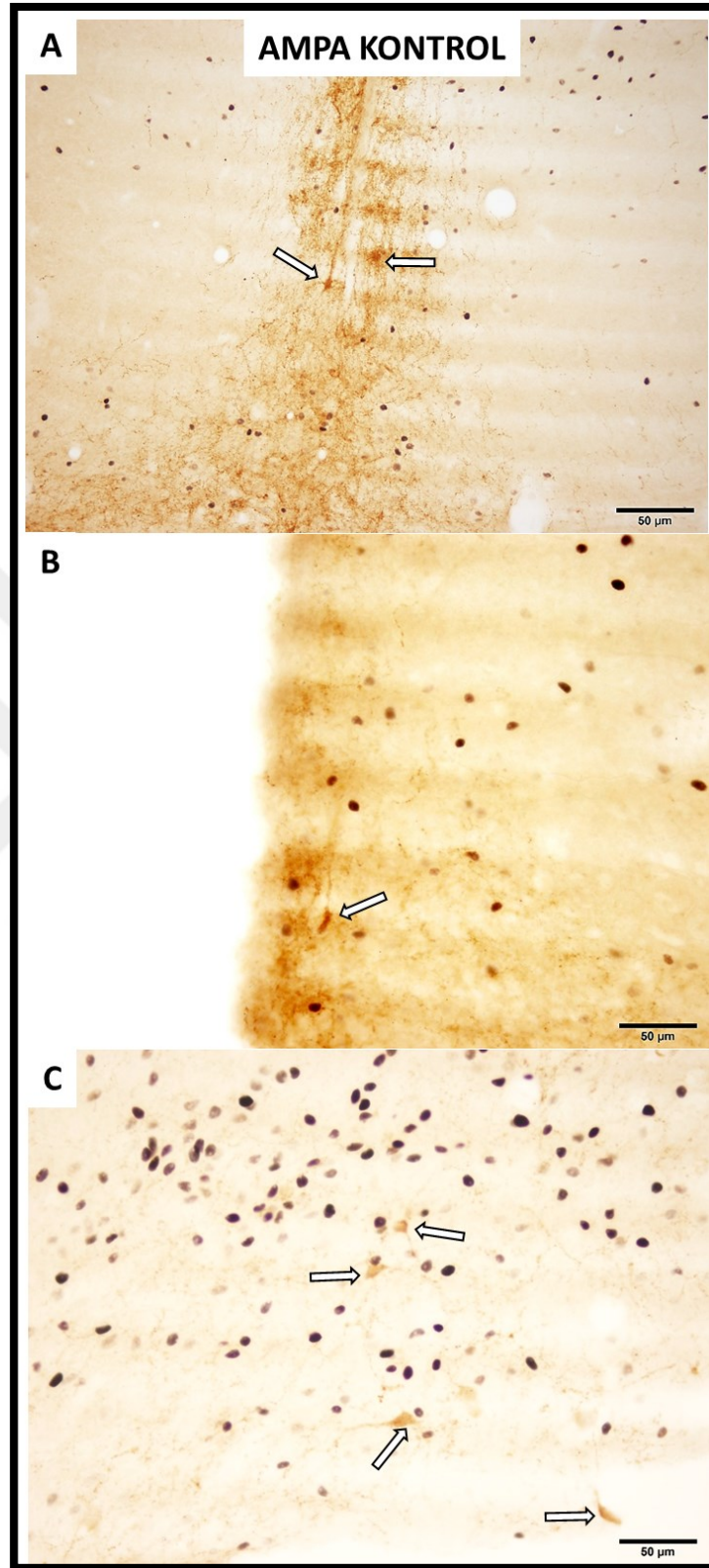
Kainik asit grubunda kisspeptin immünreaktivitesi gösteren nöronların AVPV, preoptik alan ve arkuat çekirdekte kontrol grubunda c-Fos aktivitesi göstermedikleri veya az gösterdikleri, Kainik asit verilmesi ile c-Fos aktivitelerinde anlamlı artış olduğu ve antagonisti olan CNQX verilmesi sonrasında anlamlı azalma olduğu tespit edildi (Şekil 9-11).

NMDA asit grubunda da kisspeptin immünreaktivitesi gösteren nöronların AVPV, preoptik alan ve arkuat çekirdekte kontrol grubunda c-Fos aktivitesi

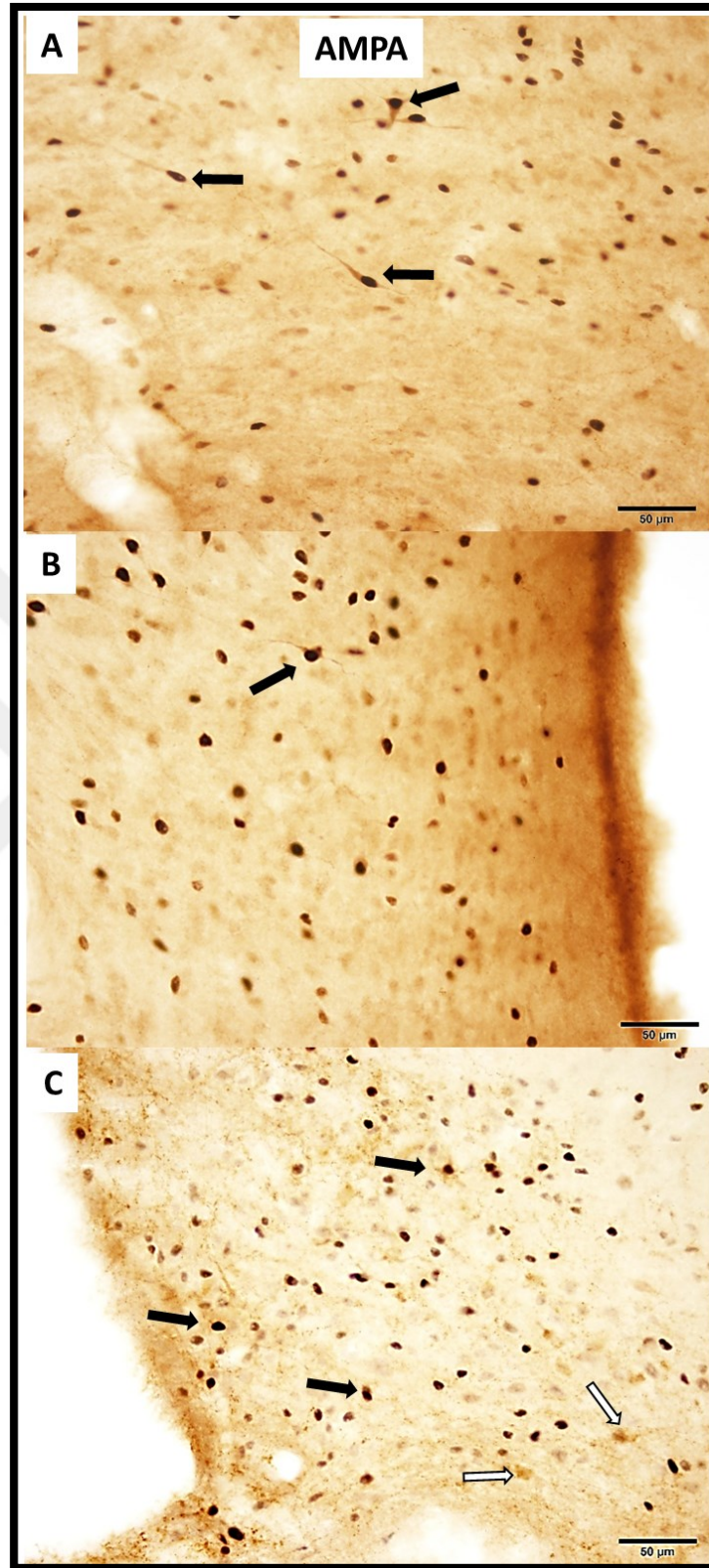
göstermedikleri veya az gösterdikleri, NMDA verilmesi ile c-Fos aktivitelerinde anlamlı artış olduğu ve antagonisti olan MK801 verilmesi sonrasında anlamlı azalma olduğu tespit edildi (Şekil 12-14).

AMPA, kainik asit ve NMDA gruplarında aktive kisspeptin nöronları yüzdeleri ve istatistiki sonuçları Şekil 15’de verilmiştir.

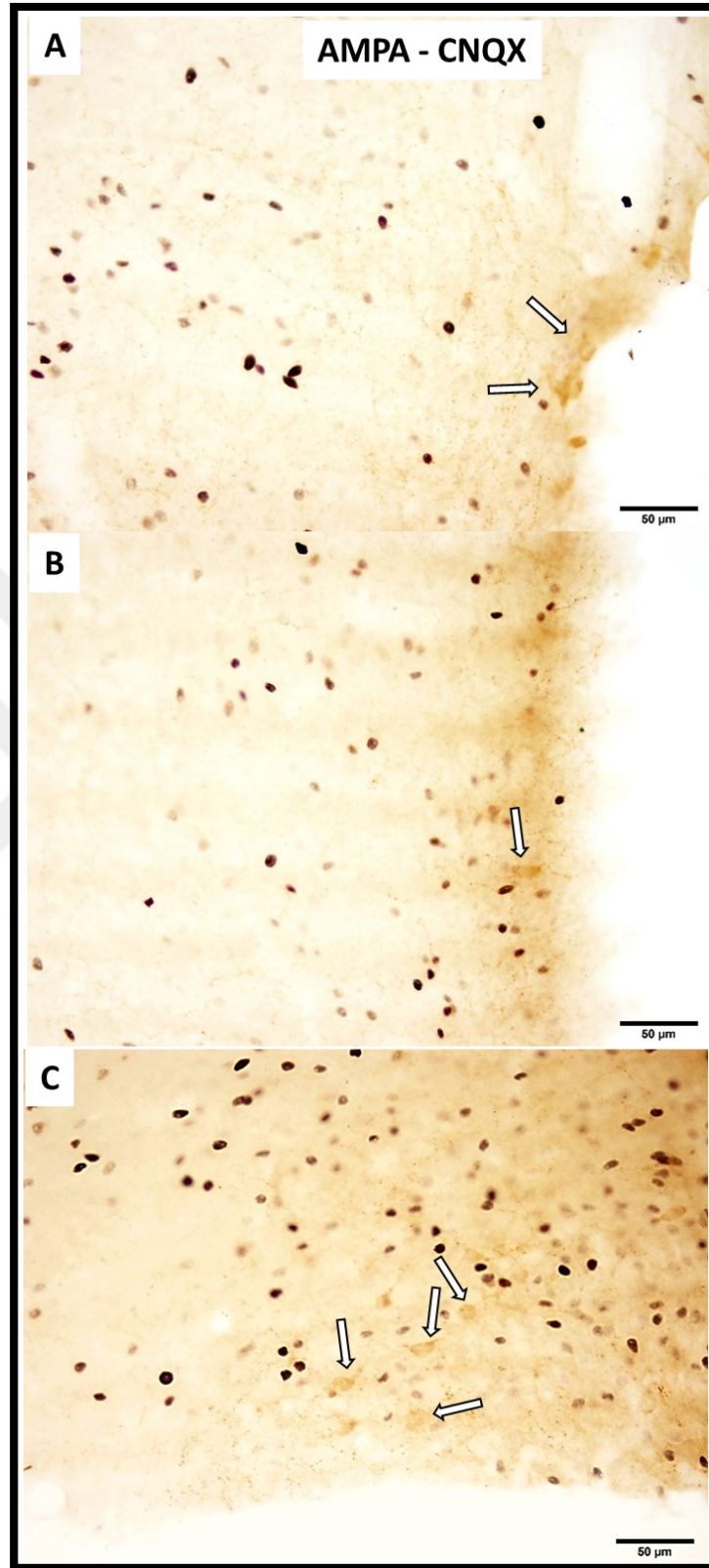
Arkuat çekirdekte immunfloresans yöntem ile agonist ya da antagonist verilmeden tespit edilen kisspeptin immünreaktivitesi ile NMDAR1 (GluN1) ve GLUR1 ve 2 (GluA1-2) reseptörleri reaktivitelerine yönelik görüntüler Şekil 16’da gruplandırılarak verilmiştir. Bulgularımızda kisspeptin nöronlarının NMDA ve AMPA reseptörleri ile birlikte immünreaktivite gösterdiği izlenmiştir.



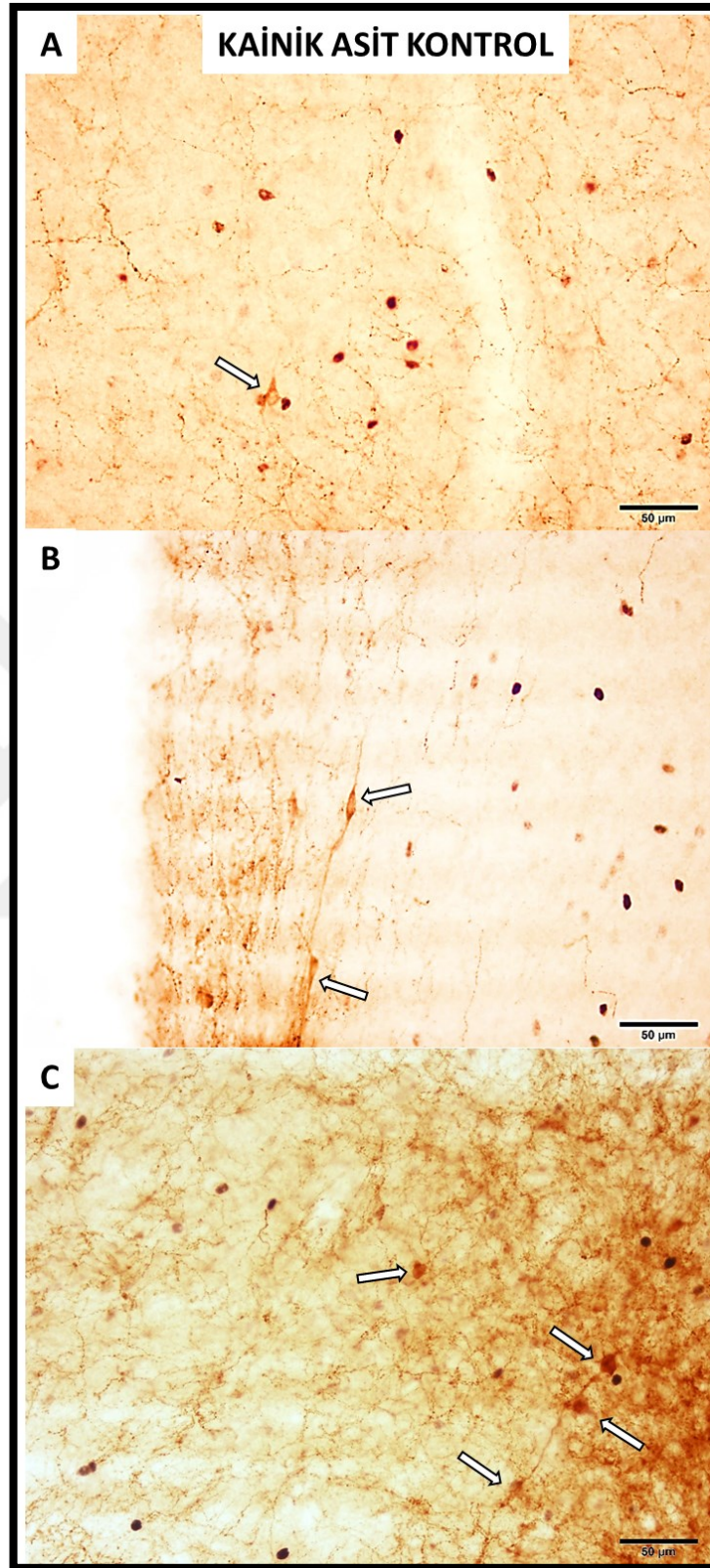
Şekil 6: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, (AMPA) kontrol grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



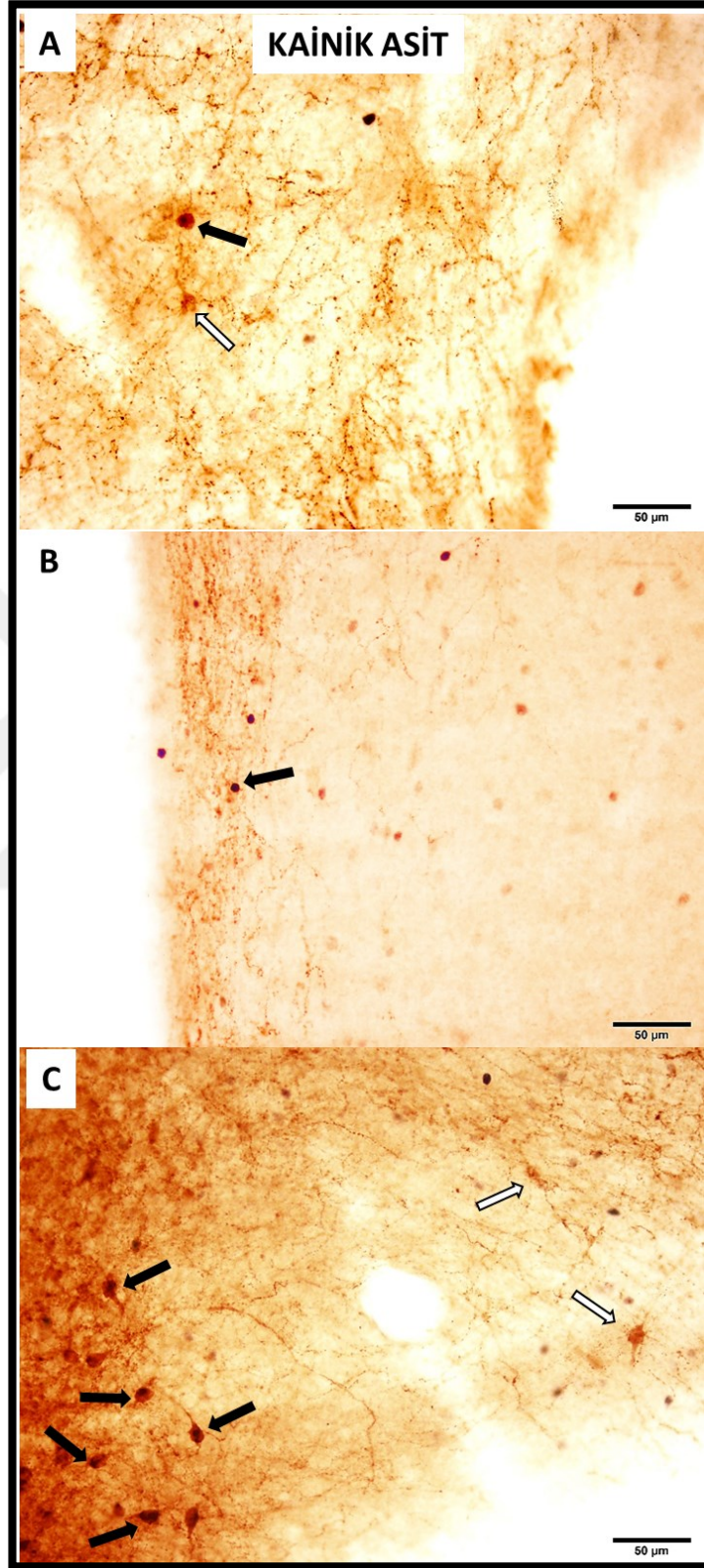
Şekil 7: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, AMPA grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar; siyah oklar: c-Fos aktivitesi gösteren nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



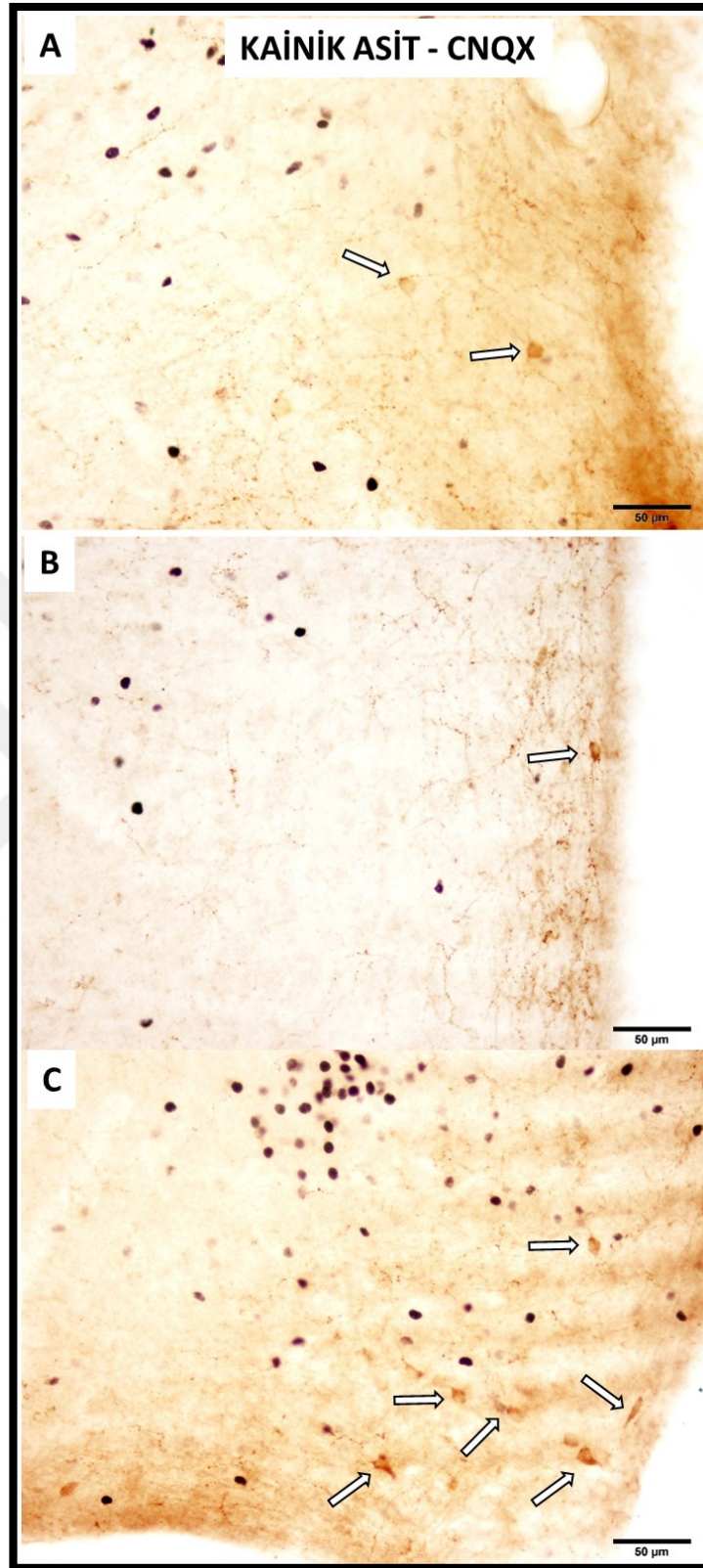
Şekil 8: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, AMPA - CNQX grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



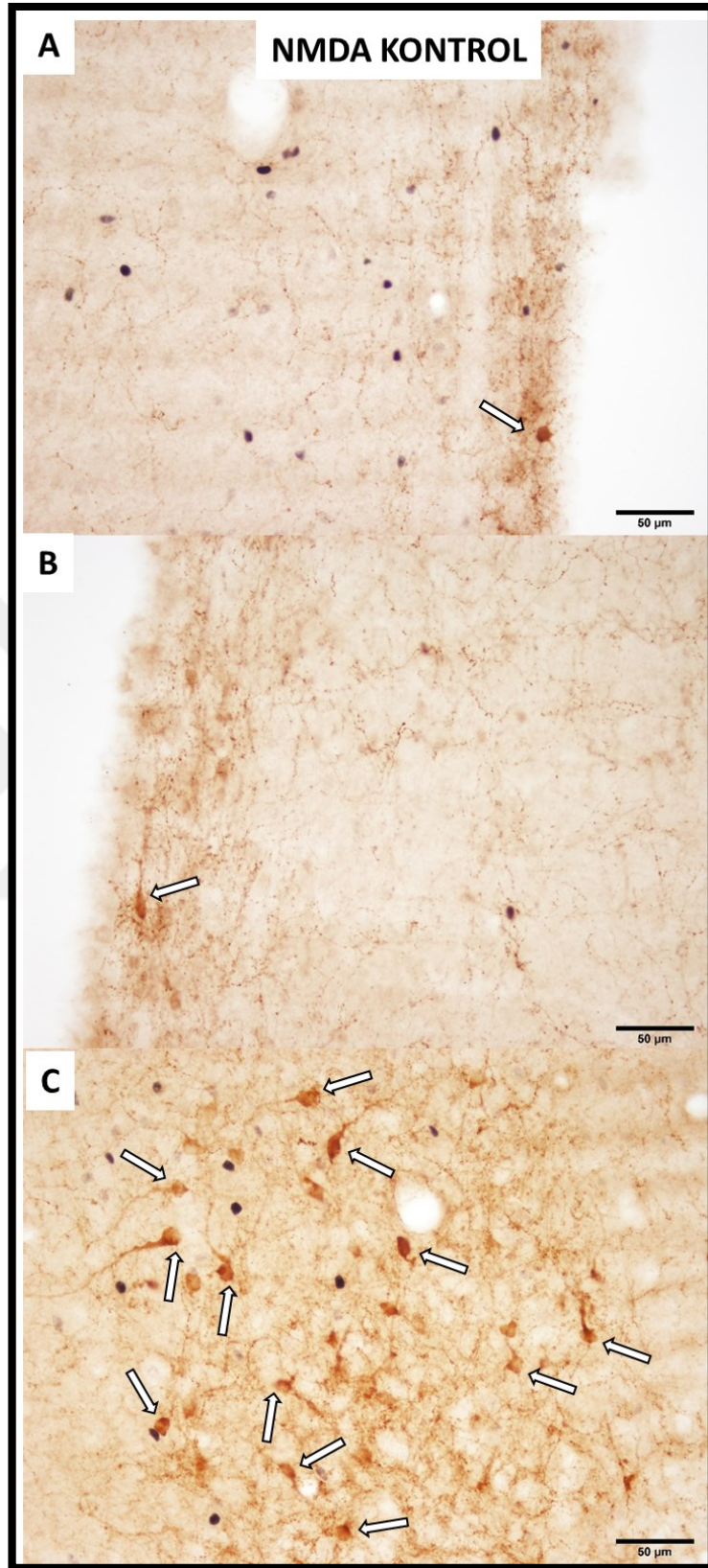
Şekil 9: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, kainik asit kontrol grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



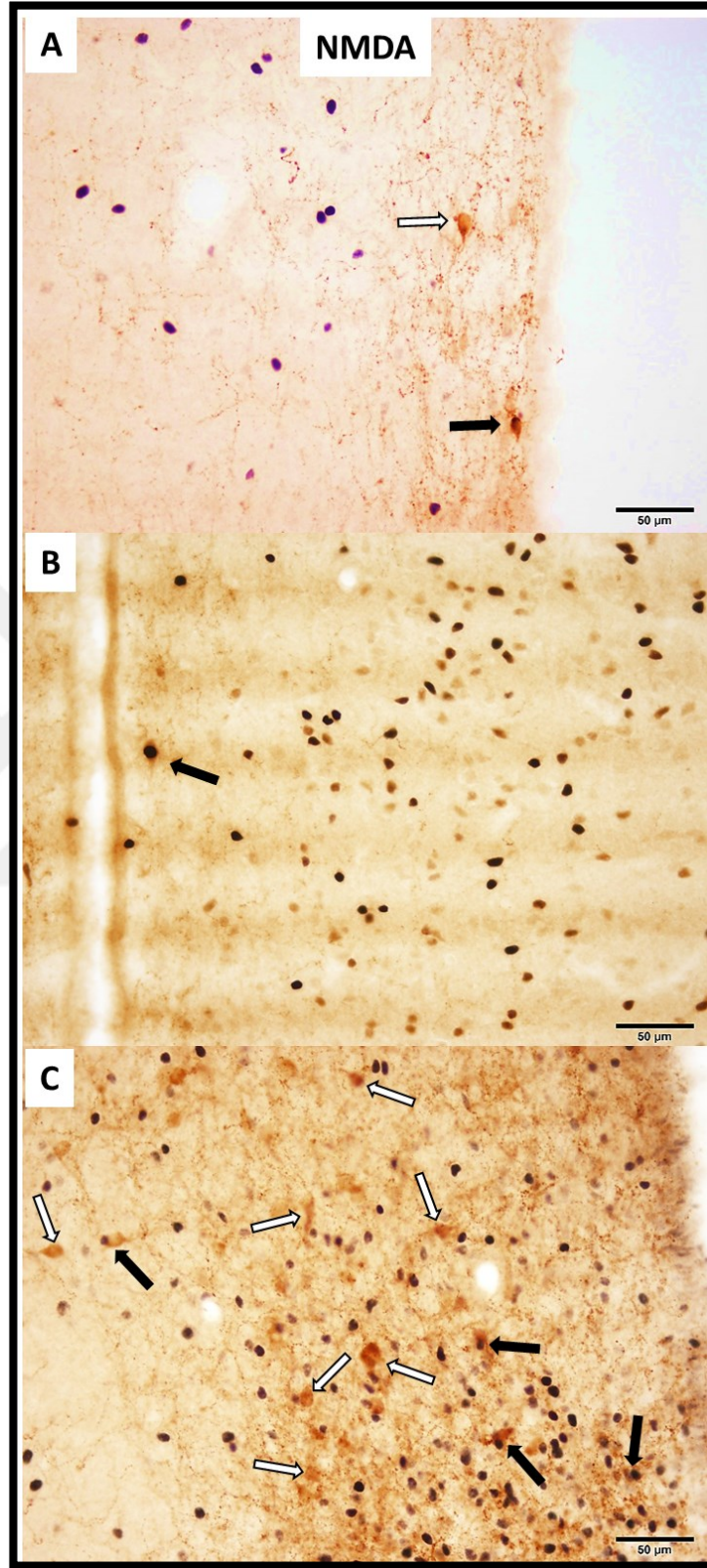
Şekil 10: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, kainik asit grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar, siyah oklar c-Fos aktivitesi gösteren nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



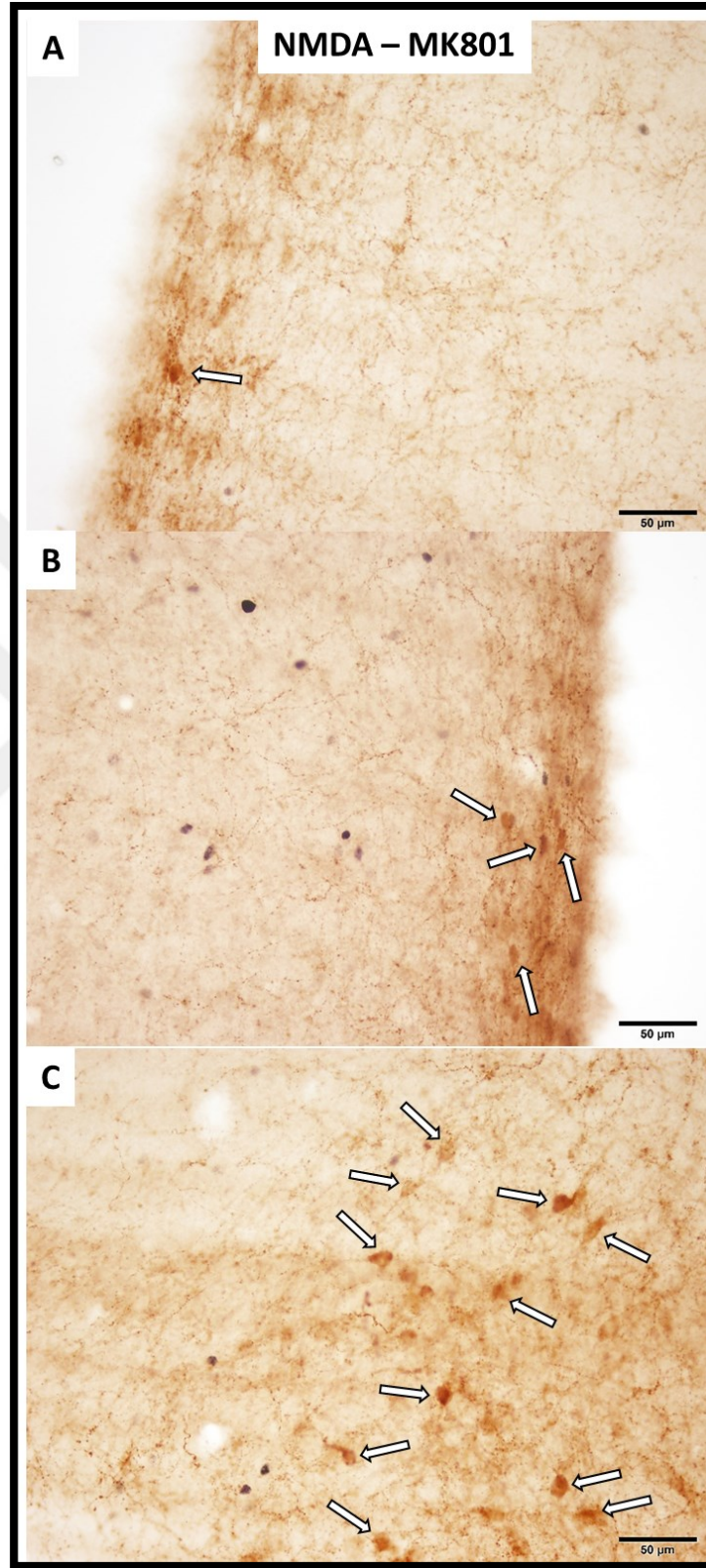
Şekil 11: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, kainik asit – CNQX grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



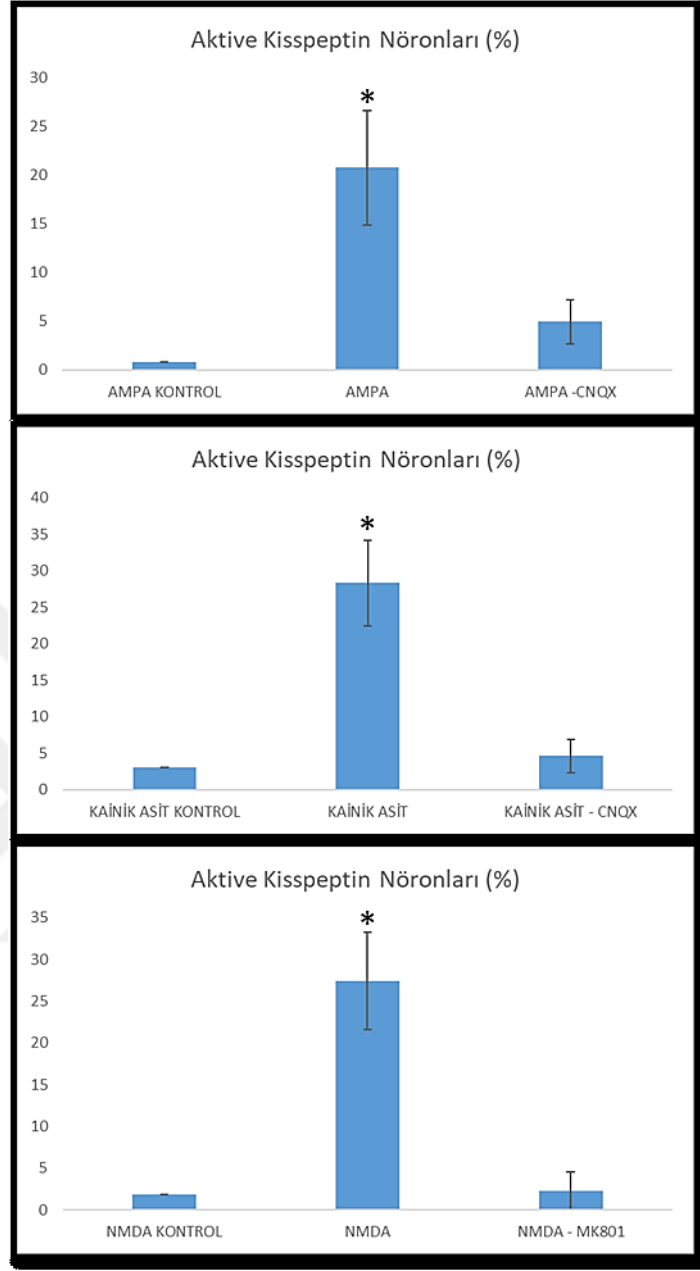
Şekil 12: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, NMDA kontrol grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



Şekil 13: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, NMDA grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar, siyah oklar c-Fos aktivitesi gösteren nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).

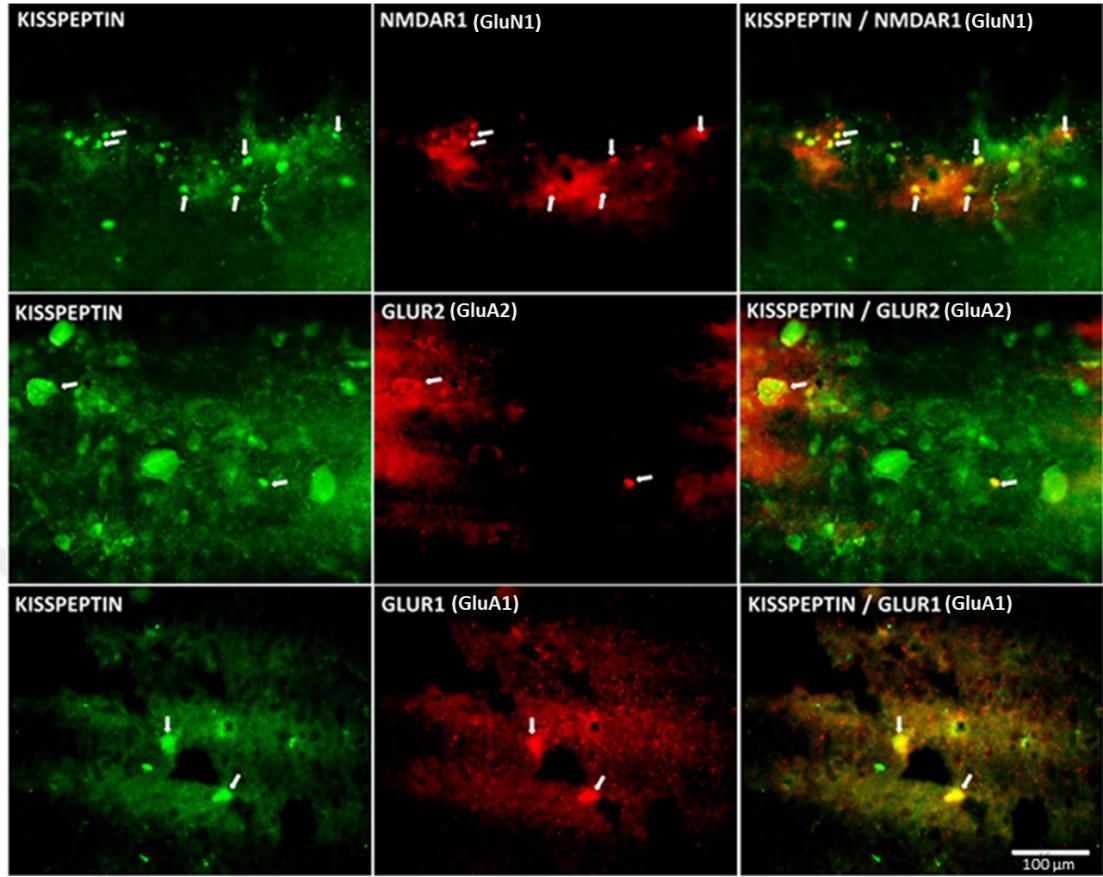


Şekil 14: Kisspeptin nöronlarında c-Fos aktivitesi, NMDA – MK801 grubu. Beyaz oklar: c-Fos aktivitesi göstermeyen nöronlar, siyah oklar c-Fos aktivitesi gösteren nöronlar. A, anteroventral periventriküler çekirdek; B, periventriküler çekirdek, C, arkuat çekirdek (Ölçek çubuğu 50 µm).



AMPA KONTROL	AMPA	AMPA - CNQX
0,83 ± 0,54	20,76 ± 5,87	4,94 ± 2,26
KAINİK ASİT KONTROL	KAINİK ASİT	KAINİK ASİT - CNQX
3,05 ± 0,87	28,29 ± 4,62	4,65 ± 3,03
NMDA KONTROL	NMDA	NMDA - MK801
1,85 ± 0,52	27,4 ± 5,23	2,31 ± 0,77

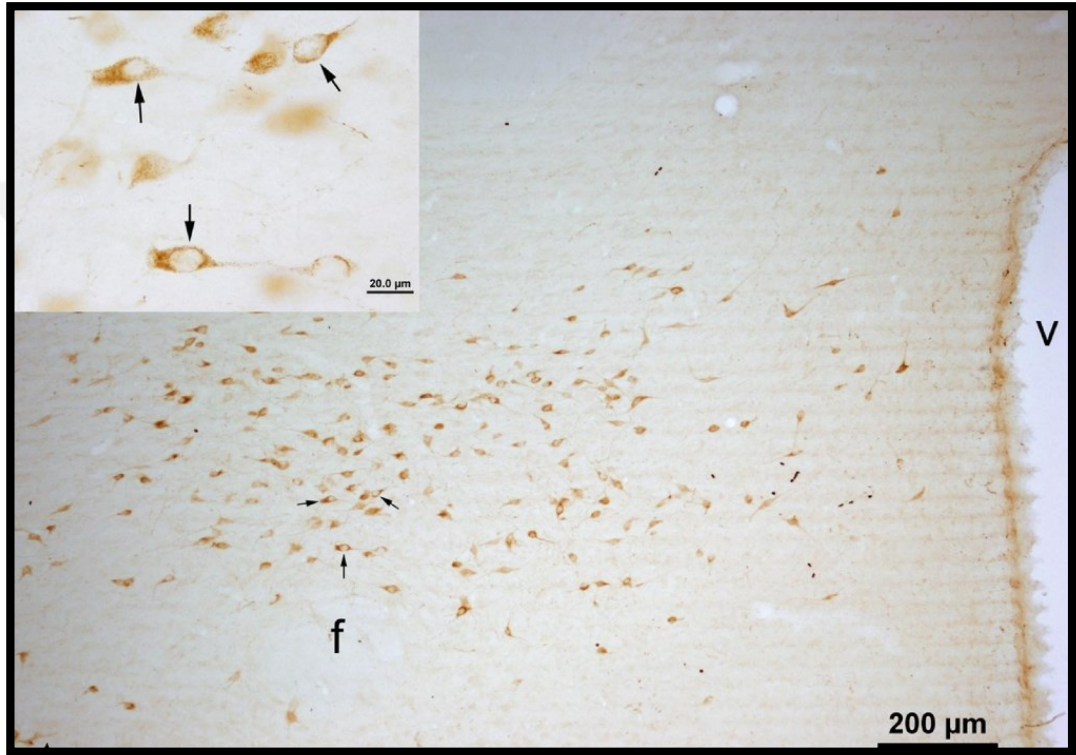
Şekil 15: AMPA, kainik asit ve NMDA gruplarında aktive (c-Fos) Kisspeptin nöronları yüzdeleri. *, Kontrol ve antagonist gruplarına karşı istatistikî anlamlılık (AMPA – AMPA kontrol arası, $p < 0,00001$; AMPA – AMPA CNQX arası $p = 0,00093$; Kainik asit – kainik asit kontrol arası, $p = 0,02352$; Kainik asit – kainik asit CNQX arası, $p = 0,00039$; NMDA – NMDA kontrol arası $p = 0,00253$; NMDA – NMDA MK801 arası $p = 0,00040$). Tüm gruplarda kontrol ve antagonist gruplar arasında istatistikî anlamlılık bulunamamıştır. Şekil içi tablo, c-Fos pozitif kisspeptin nöronlarının yüzde değer olarak ortalama ± standart hataları.



Şekil 16: Arkuat çekirdekte immüno Floresans yöntem ile kisspeptin immünreaktivitesi (sol sütun); NMDAR1 (GluN1) ve GLUR1-2 (GluA1-2) immün reaktiviteleri (orta sütun); ve üst üste getirilerek elde edilmiş görüntüler (sağ sütun). İlk iki sütunda reaktivite gösteren hücreler beyaz oklar ile gösterilmiştir. Sağ sütunda ortak aktivite gösteren hücreler (sarı renk) beyaz oklar ile gösterilmiştir (Ölçek çubuğu 100 µm).

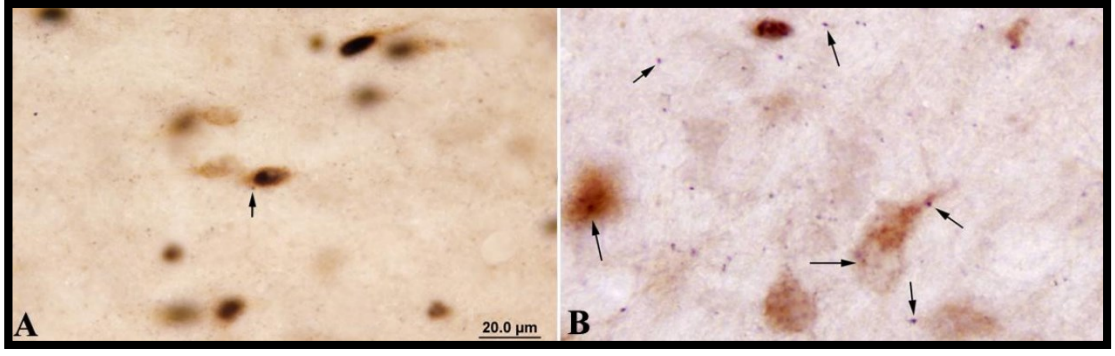
4.2. Oreksin Nöronlarında Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İncelenmesi

Oreksinerjik sistem ve oreksin nöronlarına yönelik olarak prepro-oreksin antikoruna ile gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar sonucunda oreksin nöronlarının forniks çevresinde ve lateral hipotalamusta yer aldığı kainik asit grubu çalışmalarında daha önceden belirlenmiştir (Şekil 17).



Şekil 17: Hipotalamusta prepro-oreksin-pozitif nöronların dağılımı. Nöronların perifornikal alandaki yerleşimleri dikkat çekmekte. Küçük resimde prepro-oreksin immunoreaktif nöronlar (oklar) izlenmekte (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010) (V: üçüncü ventrikül, f: forniks) (Ölçek çubuğu 200 µm).

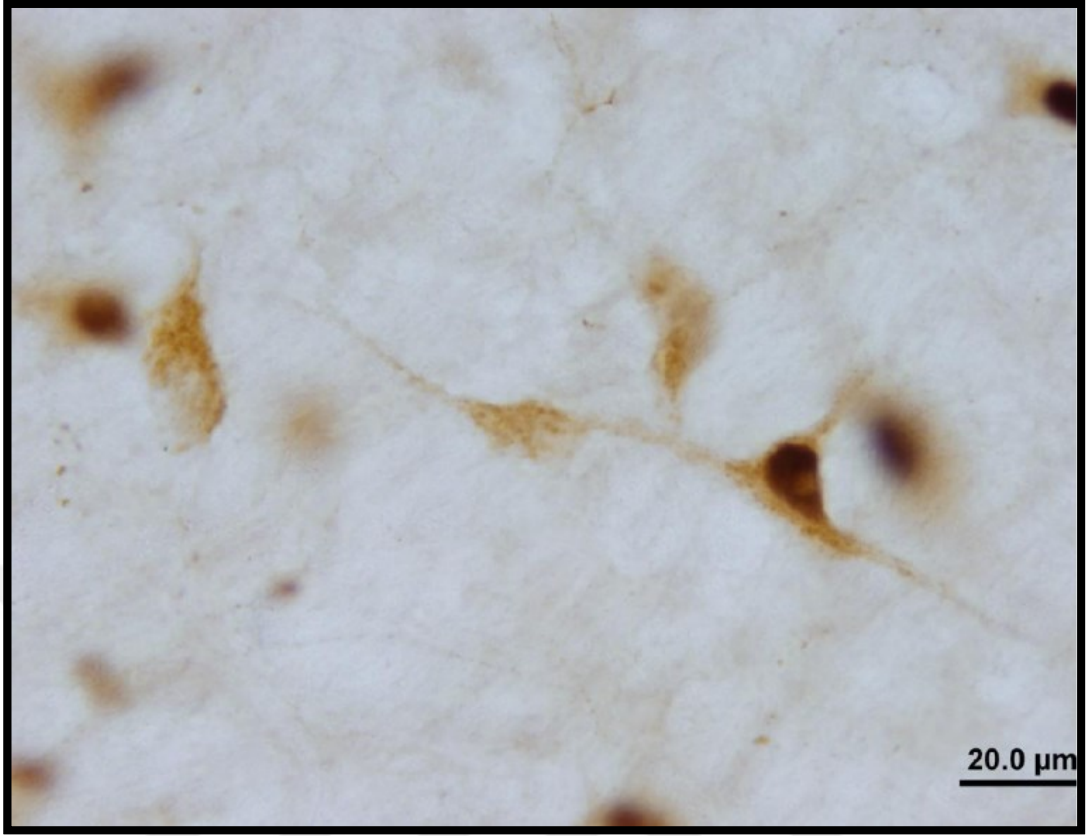
Çalışmalarımızda oreksin nöronlarının VGluT içeren akson sonlanmalarıyla yakın komşuluk gösterdiği belirlendi ve yapılan boyamalarla oreksin nöronlarıyla temasta olan VGluT3-pozitif akson sonlanmalarının (Şekil 18 B), VGluT2 içerenlere göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 18 A).



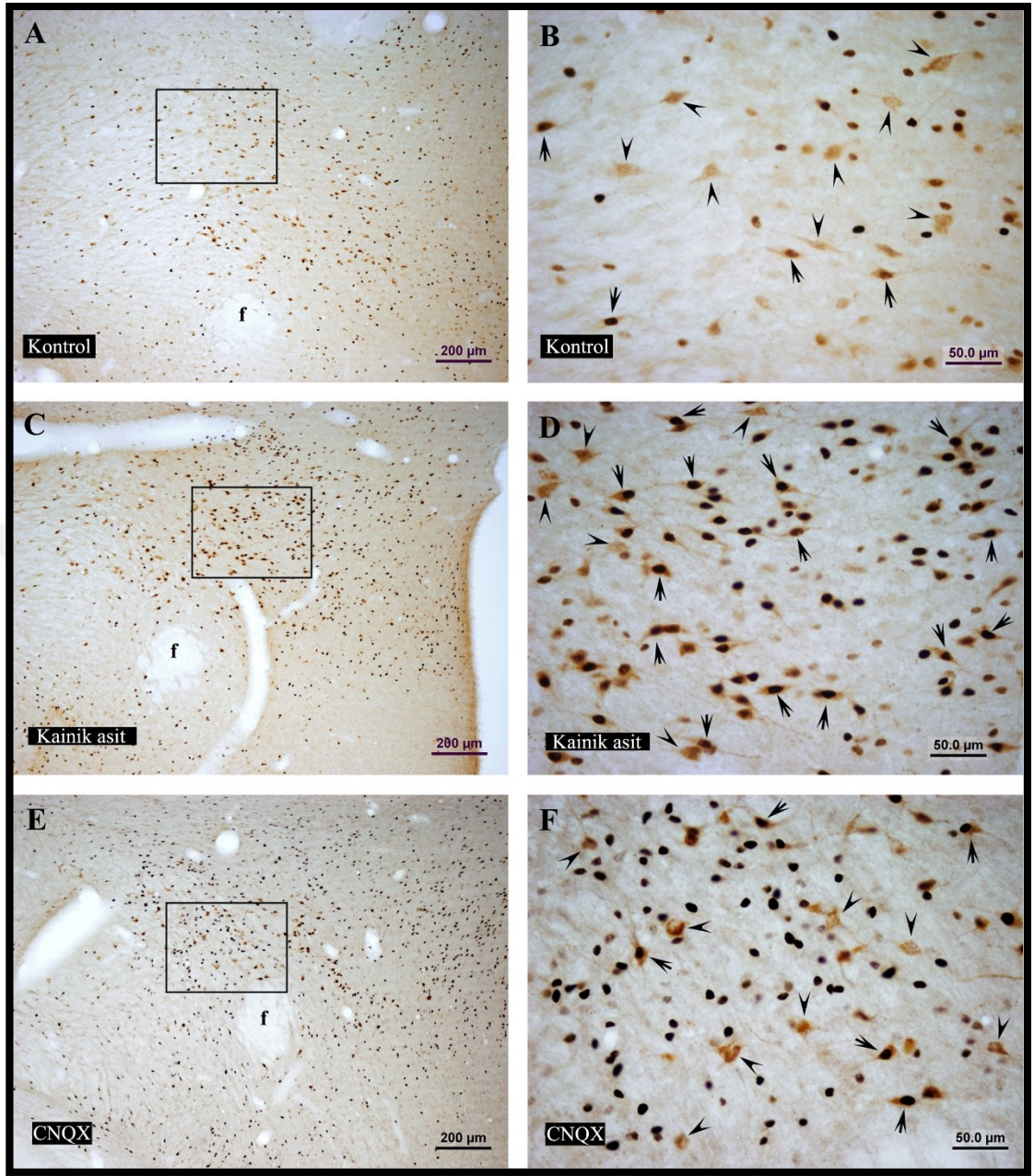
Şekil 18: Oreksin nöronlarının VGLUT2 ve VGLUT3 içeren akson sonlanmaları ile ilişkisi. Oreksin nöronlarının VGLUT2 (A) ve özellikle VGLUT3 içeren (B) akson sonlanmalarıyla yakın komşuluk gösterdiği izlenmekte (Oklar: VGLUT immünoreaktivitesi) (Ölçek çubuğu 20 µm).

Oreksin nöronlarının non-NMDA glutamat agonistlerinden kainik asit ve antagonisti CNQX'in etkileriyle aktive olduklarına dair çalışma laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilmiştir (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010). Burada sunulan tez çalışması kapsamında ise oreksin nöronlarında glutamatın AMPA ve NMDA reseptör agonistlerinin ve bu reseptörlere özgü antagonistlerinin nöronal aktivasyona etkileri incelenmiştir.

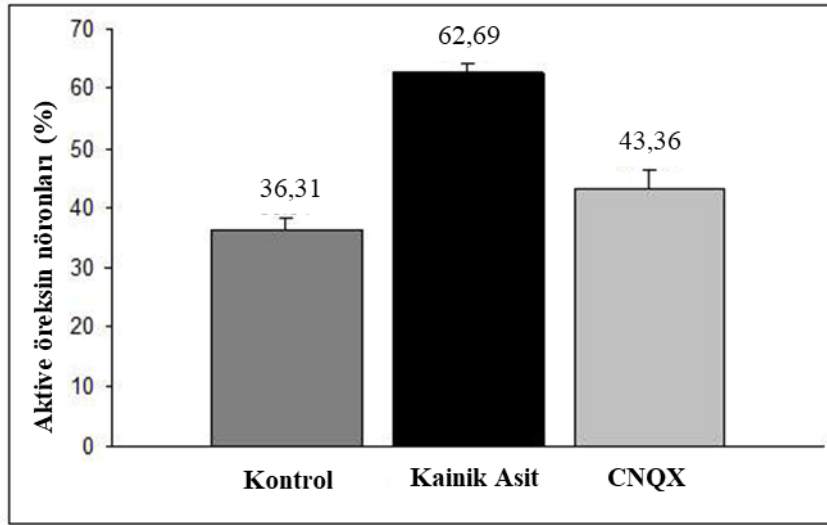
Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010) kainik asit ve CNQX etkileri araştırılmış ve c-Fos ekspresyonunu belirlemek amacı ile yapılan ikili boyamalarda c-Fos pozitif ve negatif nöronlar görülmüştür (Şekil 19). Mikroskobik veriler incelendiğinde; kontrol grubunda tüm oreksin nöronlarının yaklaşık %36'sında c-Fos ekspresyonu belirlenmiştir (Şekil 20 A, B). Kainik asit verilen deneklerde c-fos eksprese eden oreksin nöronlarının yüzdesinin yaklaşık bir kat artarak ortalama %62'ye ulaştığı (Şekil 20 C, D), CNQX enjeksiyonunu takiben kainik asit verilen grupta, CNQX etkisiyle c-Fos içeren nöron yüzdesinin %43'e düştüğü belirlenmiştir (Şekil 20 E, F). Yapılan istatistiki incelemeler, hem kainik asitin c-Fos eksprese eden oreksin nöron sayısını artırıcı etkisinin, hem de CNQX'in bu artışı baskılayıcı etkisinin anlamlı olduğunu göstermiş ($p < 0,001$) ve elde edilen sayısal veriler Şekil 21 ve Tablo 4'de özetlenmiştir. Glutamatın tüm agonistlerine ve antagonistlerine ait bulguların bir bütünlük taşıması amacıyla laboratuvarımızdaki geçmiş çalışmalardan elde edilen sonuçlar bu tezin bulgular kısmına eklenmiştir.



Şekil 19: Aktive olmuş oreksin nöronlarının görünümü. Aktive olmuş oreksin nöronları, prepro oreksin-pozitif nöronlarda çekirdek işaretlenmesinin varlığı ile ayırt edilmekte (sağdaki nöron). c-Fos-negatif nöronlarda çekirdek işaretlemesi olmaksızın sadece sitoplazmik immünoreaktivite izlendi (soldaki nöron), (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010) (Ölçek çubuğu 20 μm).



Şekil 20: Oreksin nöronlarında kontrol (A, B), kainik asit (C, D) ve CNQX (E, F) gruplarının görüntüleri. Tüm gruplarda görüntüler perifornikal alandan elde edildi. Sağ sütundaki fotoğraflarda (B, D, F), sol sütunda (A, C, E) kare içine alınmış bölgenin yüksek büyütme objektif ile elde edilen görüntüler izlenmekte. Oklar c-Fos-pozitif, ok başları ise c-Fos-negatif prepro-oreksin işaretli oreksin nöronlarını göstermekte, (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010) (Ölçek çubuğu 50 µm).

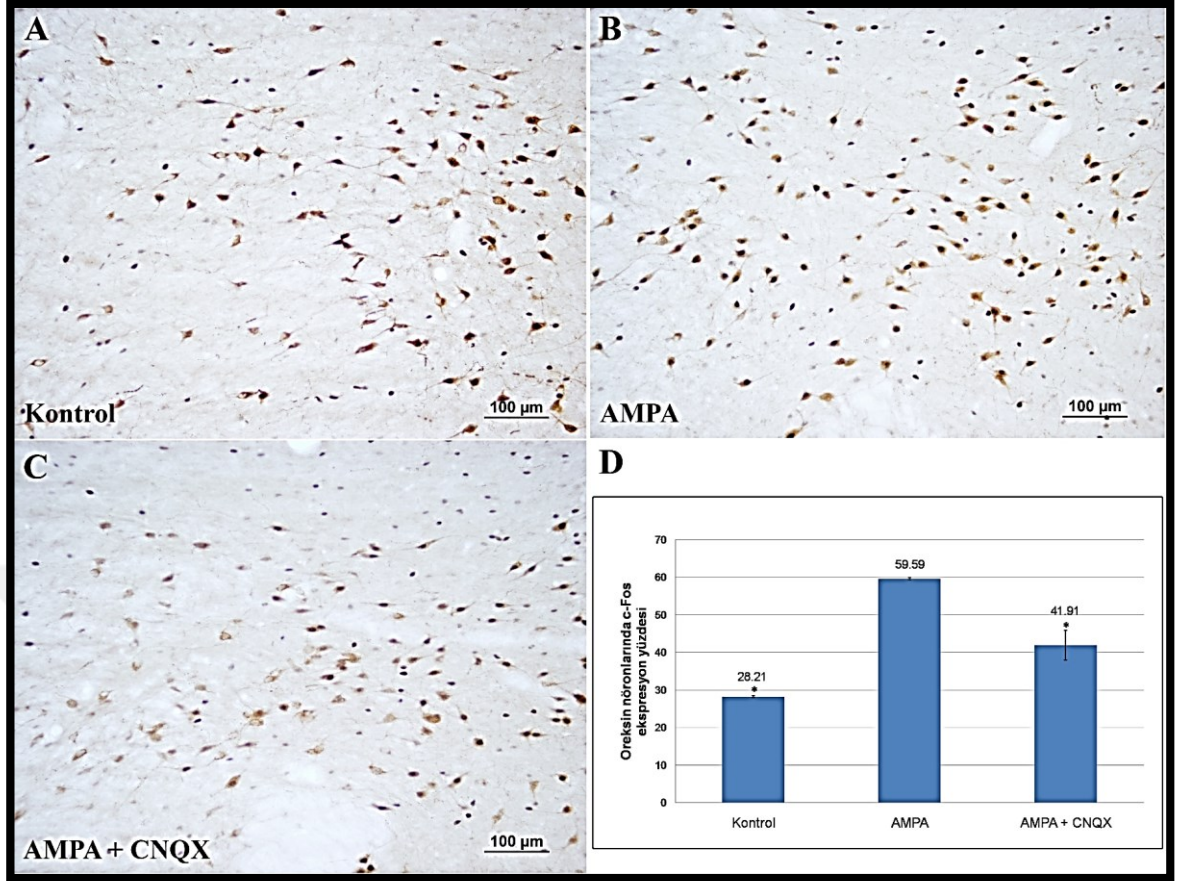


Şekil 21: Oreksin nöronlarında kainik asitin aktive edici etkisinin grafiksel gösterimi. Kainik asit verilen deneklerde c-Fos eksprese eden oreksin nöron yüzdesi istatistiki anlamı olan bir artma göstermiştir (**p<0,001), (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010).

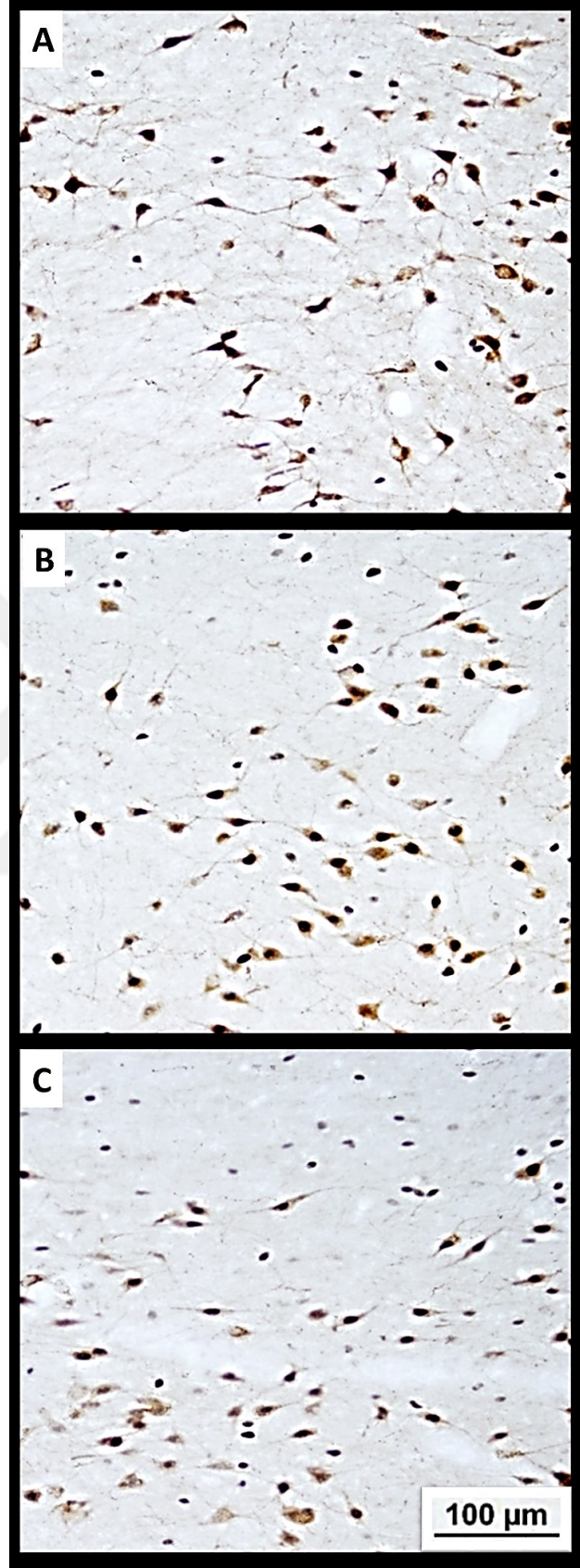
Tablo 4: Oreksin nöronlarında c-Fos ekspresyonu. Tabloda, sayılan nöron sayıları ve ikili kolokalizasyon yüzdeleri ortalama $\pm$ standart hata (SH) şeklinde verilmiştir (n=5). Kainik asit grubu ile hem kontrol hem de CNQX grubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur (**p<0,001). , (Eyigor, Minbay & Cavusoglu, 2010).

Gruplar	Oreksin-pozitif nöron sayısı/denek	c-Fos-pozitif oreksin nöron sayısı/denek	c-Fos-pozitif oreksin ortalama nöron yüzdesi/denek
Kontrol	534 $\pm$ 48,46	196,6 $\pm$ 26,21	36,31 $\pm$ 2,05
Kainik asit (2,5 mg/kg)	473,6 $\pm$ 44,65	295,4 $\pm$ 25	62,69 $\pm$ 1,44***
CNQX	683 $\pm$ 110,16	309,6 $\pm$ 5,76	43,36 $\pm$ 3,12

Tez çalışmaları kapsamında olan AMPA ve CNQX başlıklı deneylerimizde; AMPA uygulamasının oreksin nöronlarında önemli oranda aktivasyona neden olduğu ve non-NMDA glutamat reseptör antagonisti CNQX etkisiyle bu aktivasyonda kısmi bir baskılanma ortaya çıktığı belirlendi. Yapılan istatistiki değerlendirmede, c-Fos ile ko-lokalize olan oreksin nöronlarının tüm oreksin nöronlarına oranında kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu ve bu oranın %28'den %59'a yükseldiği belirlenirken (p<0,005) CNQX etkisiyle kolokalizasyon nöron yüzdesinin istatistiki anlamlı olan %41'e gerilediği bulundu (p<0,05) (Şekil 22-23).

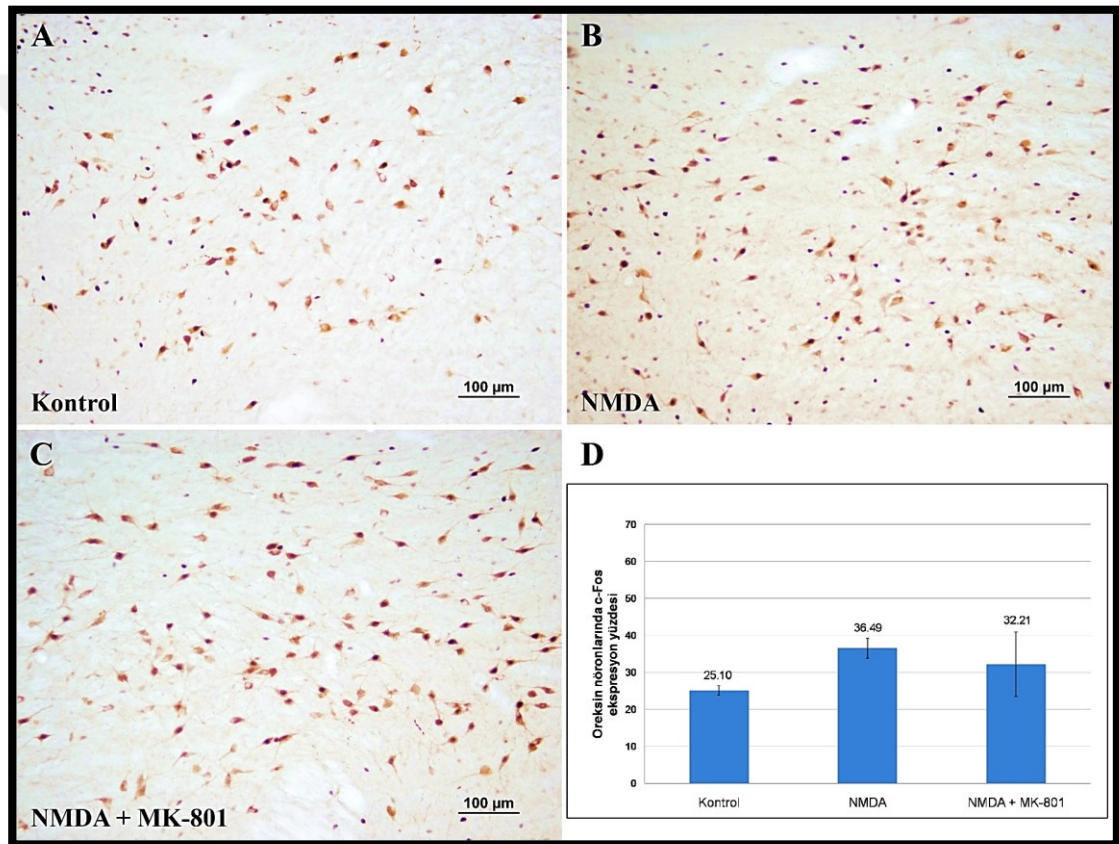


Şekil 22: Oreksin nöronlarında AMPA'nın etkisi. Kontrol grubu (A) ile karşılaştırıldığında daha çok sayıda oreksinerjik nöronun AMPA etkisi ile c-Fos eksprese ettiği (B), CNQX uygulamasını takiben bu sayının azaldığı (C), elde edilen verilerin istatistiksel anlam taşıdığı (D) görülmekte (Ölçek çubuğu 100 µm).

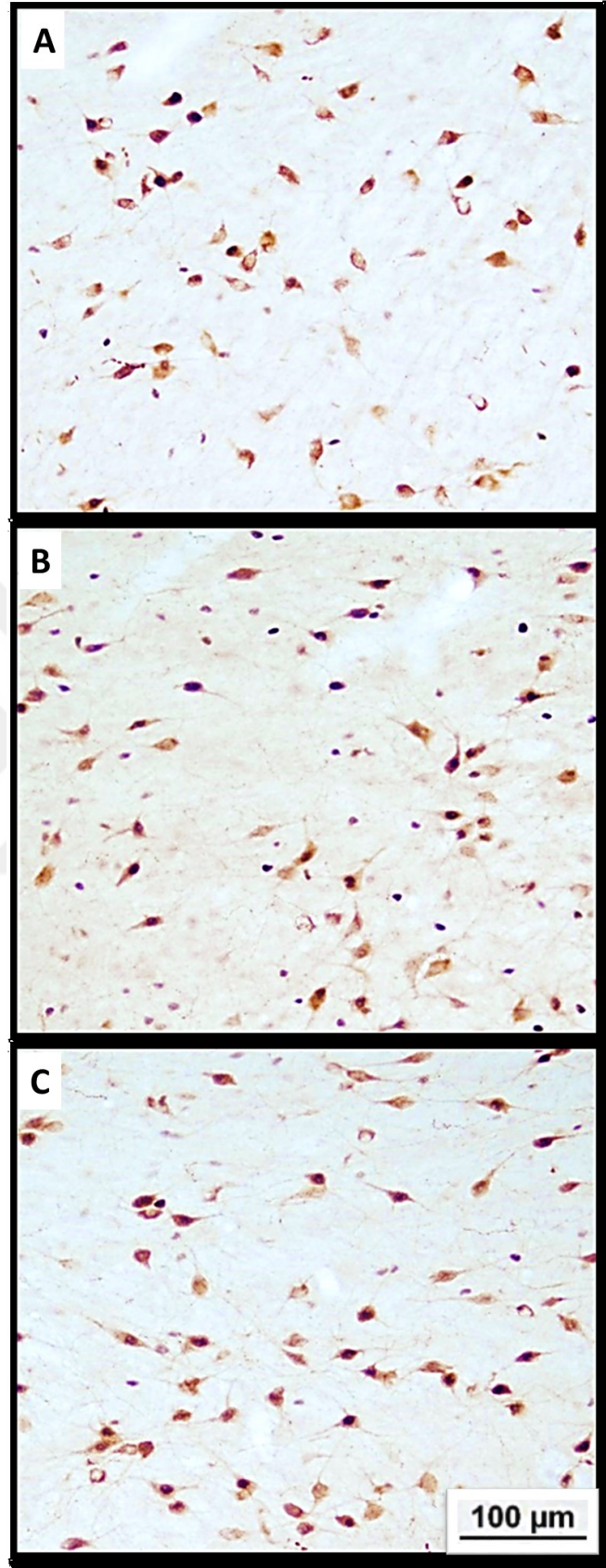


Şekil 23: Oreksin nöronlarında AMPA'nın etkisi (büyütülmüş görüntüler). Kontrol grubu (A), AMPA (B), AMPA - CNQX (C) (Ölçek çubuğu 100 µm).

Tez çalışmaları kapsamında olan NMDA ve MK-801 başlıklı deneylerimizde; NMDA'nın oreksin nöronları üzerinde aktive edici bir etkisinin olmadığı belirlendi. Kontrol grubunda %25 olan c-Fos-pozitif oreksin nöron oranının, NMDA etkisi altında biraz arttığı (%36), ancak; bu yükselişin istatistiksel anlamlılık taşımadığı görüldü. NMDA reseptör antagonisti MK-801 etkisiyle de aktive olan nöron yüzdesinde (%32) istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 24-25).



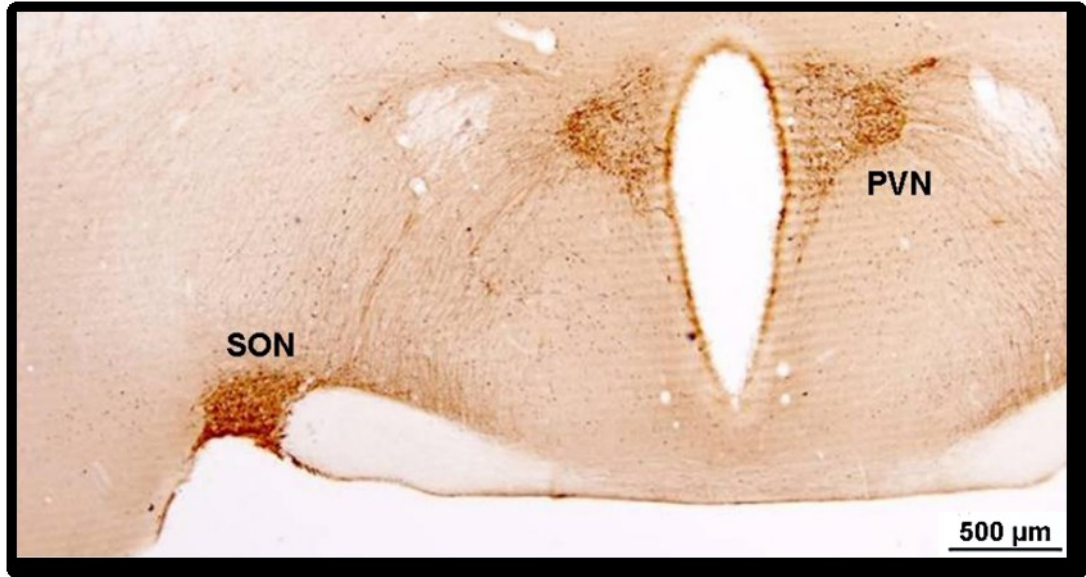
Şekil 24: Oreksin nöronlarında NMDA'nın etkisi. Kontrol (A), NMDA (B) ve MK-801 (C) gruplarında bazı oreksin nöronlarının c-Fos-pozitif olduğu bazı nöronların ise c-Fos reaksiyonu içermedikleri görülmekte. Verilerin analizi ile elde edilen grafikte (D) gruplar arasında aktive olan nöron sayısında anlamlı bir değişiklik olmadığı izlenmekte (Ölçek çubuğu 100 µm).



Şekil 25: Oreksin nöronlarında NMDA'nın etkisi (büyütülmüş görüntüler). Kontrol (A), NMDA (B) ve NMDA - MK-801 (C) (Ölçek çubuğu 100 µm).

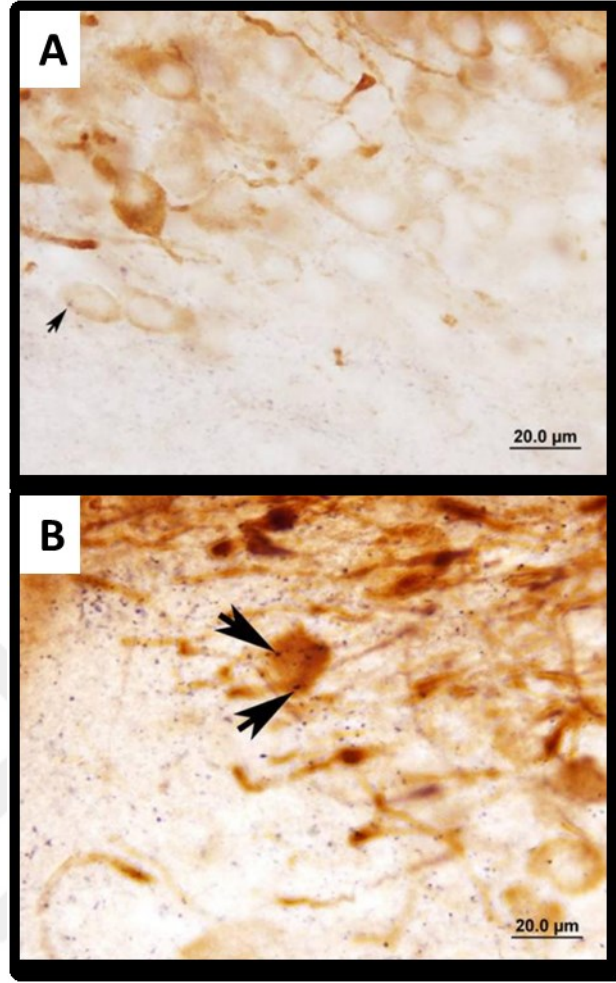
4.3. Vazopressin Nöronlarında Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İncelenmesi

Vazopressin antikoru ile gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar sonucunda vazopressinerjik nöronların hipotalamusun esas olarak SON ve PVN’de yerleşik oldukları belirlendi (Şekil 26). SON’de magnosellüler nöronlarda ve çekirdeğin tüm alanına yayılmış olarak vazopressinerjik nöronlar görüldü. Paraventriküler çekirdekte hem magnosellüler hem de parvisellüler bölümlerinde yer alan nöronların vazopressin antikoru ile işaretlendiği belirlendi. Işık mikroskop ile yapılan incelemelerde, vazopressinin sitoplazmik içeriğinin yoğun olduğu tespit edildi. Ayrıca vazopressin nöronlarının aksesuar çekirdeklerde küçük gruplar oluşturduğu izlendi. Daha az sayıda vazopressin nöronu SCN’de belirlendi.



Şekil 26: 3. ventrikülün üst iki yanında lokalize paraventriküler çekirdeklerde (PVN) ve optik kiazmanın lateral uçlarının yanında yerleşik supraoptik çekirdeklerde (SON) çok sayıda nöronun vazopressin sentezlediği izlenmekte (Ölçek çubuğu 500 µm).

VGluT antikorları ile yapılan ikili boyamalarda vazopressin nöronlarına bitişik lokalizasyon gösteren immün pozitivite izlendi. Bu çalışmaların sonucunda vazopressin nöronlarının VGluT2 ve VGluT3 içeren glutamaterjik nöronlar tarafından innerve edildikleri gösterildi (Şekil 27).



Şekil 27: Vazopressin nöronları ile temasta olan VGlut-pozitif akson sonlanmaları. VGlut2 (A) ve VGlut3 (B) içeren butonların vazopressin immünoreaktif nöronlarla süperpoze oldukları görülmekte (oklar). Çevrede çok sayıda Ni-DAB işaretli glutamaterjik nöron akson sonlanmasının (koyu mavi-siyah renkli noktalar) vazopressin ile işaretli olmayan alanlarda dağıldığı izlenmekte (Ölçek çubuğu 20 µm).

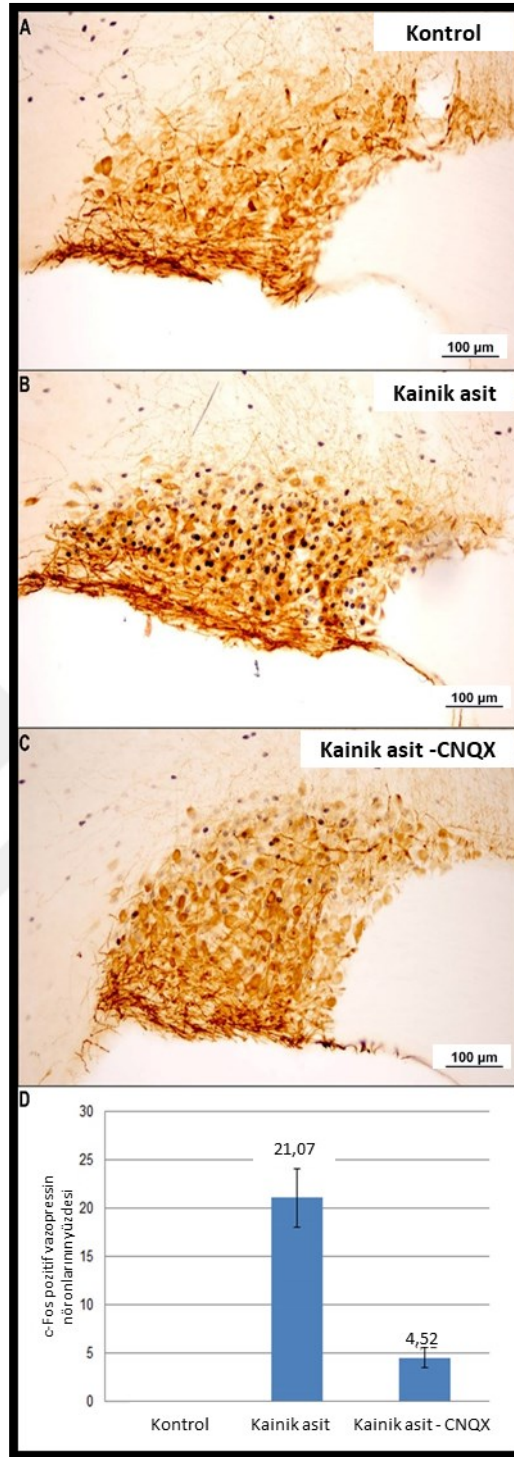
Vazopressin nöronlarının glutamaterjik aktivasyonu açısından; vazopressin nöronlarının her üç glutamat agonisti uygulamasına da aktivasyon yanıtı verdiği görüldü. Bu aktivasyonun uygun antagonistin ön uygulamasıyla kısmen baskılandığı bulundu.

Kainik asit ve CNQX başlıklı deneylerimizde; c-Fos ekspresyonunu işaretlemek amacı ile yapılan ikili boyamalar incelendiğinde; hipotalamik SON'de yer alan vazopressinerjik nöronların bazal şartlarda aktive olmadıkları kontrol grubu deneklerde c-Fos eksprese eden nöron görülmemesiyle belirlendi. Kainik asit uygulamasını takiben yaklaşık %21 oranında vazopressin nöronunda c-Fos varlığı, dolayısıyla aktivasyon belirlendi (kontrole göre $p < 0,05$). CNQX etkisiyle bu artışın

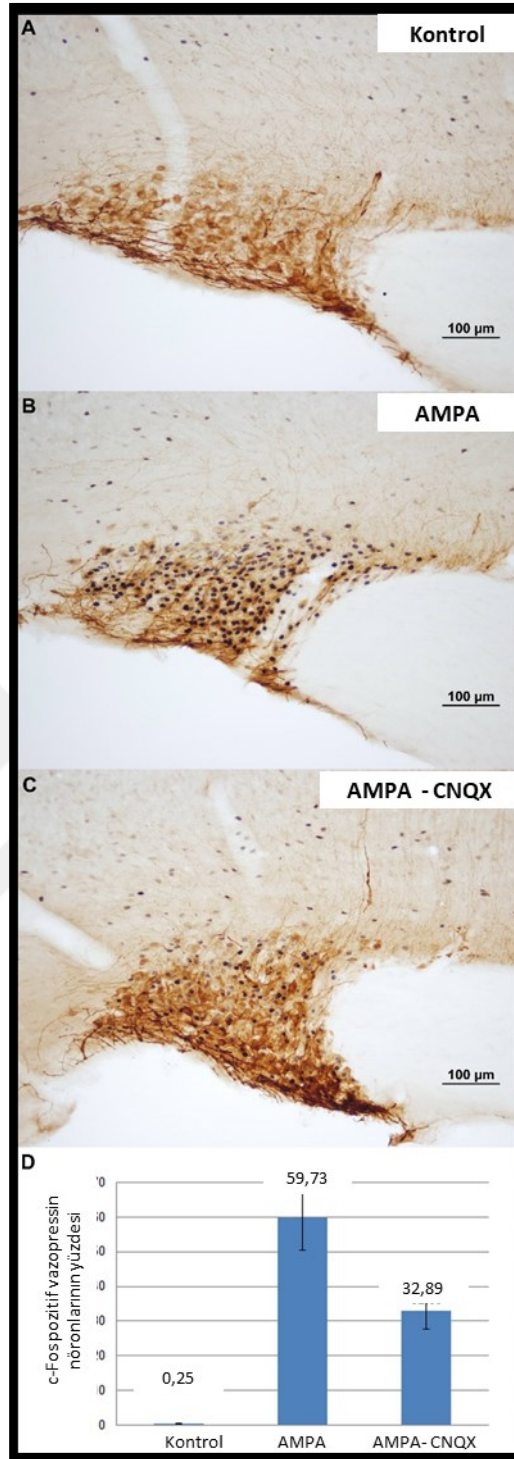
%4'lere gerilediği görüldü (kontrole göre $p>0,05$). İstatistiki anlamlılık gösteren bu verilere ait resimleri ve özet grafik Şekil 28'te sunulmuştur.

AMPA ve CNQX başlıklı deneylerimizde; Kontrol grubunda, vazopressin nöronlarının çok azında c-Fos ekspresyonu görüldü (%0,25). AMPA etkisiyle SON'de yerleşik vazopressinerjik nöronların yarısından fazlasının (%59) aktive olduğu ve bunun istatistiki olarak anlamlı olduğu ($p<0,005$) belirlendi. CNQX etkisiyle c-Fos-pozitif nöron sayısının %32'ye gerilediği ve bu baskılayıcı etkinin anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 29).

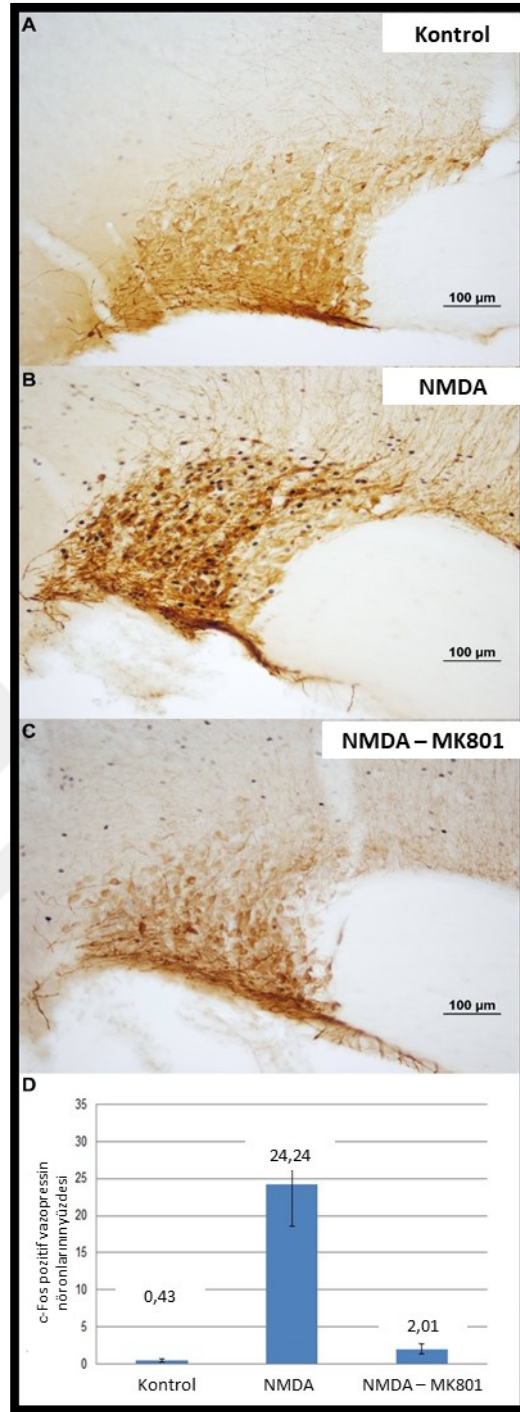
NMDA ve MK-801 başlıklı deneylerimizde; NMDA etkisiyle vazopressinerjik nöronlarda c-Fos ekspresyon oranının %0,43'ten (kontrol grubu) %24'e yükseldiği belirlendi. $p<0,005$ değeriyle istatistiki anlam taşıyan bu artışın MK-801 etkisiyle anlamlı olarak gerilediği ve %2'ye düştüğü görüldü ($p<0,005$). Çalışmalarla ilgili örnek resimler ve özet grafik Şekil 30'te verilmiştir.



Şekil 28: Vazopressin nöronlarında kainik asidin etkisiyle c-Fos aktivasyonu. Kontrol grubunda vazopressin nöronlarında c-Fos görülmezken (A), kainik asit grubunda cFos-pozitif nöron sayısının arttığı izlenmekte. (B). CNQX etkisiyle aktive olan nöron sayısında azalma göze çarpmakta (C). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde AMPA'nın vazopressin nöronlarını aktive edici etkisi görülmekte (D) (Ölçek çubuğu 100 μ m).



Şekil 29: Vazopressin nöronlarına AMPA'nın etkisi. Kontrol grubunda (A) c-Fos içeren vazopressinerjik nöron görülmezken, AMPA etkisi ile sayılan nöronların yarından fazlasında aktivasyon olduğu görülmekte (B). CNQX'in etkisi ile aktive nöron sayısında azalma izlenmekte (C). Veri analizinde, agonist ve antagonist uygulamaları sonrası c-Fos eksprese eden nöron sayısındaki artma ve azalmaların anlamlı olduğu anlaşılmakta (D) (Ölçek çubuğu 100 µm).



Şekil 30: Vazopressin nöronlarına NMDA'nın etkisi. Kontrol grubunda çok az nöronda c-Fos ekspresyonu varken NMDA'nın etkisiyle aktive hücre sayısının yaklaşık %25 arttığı (B), MK-801 uygulaması sonrası ise bu oranın neredeyse kontrol seviyesine gerilediği görülmekte (C). Veri analizinde istatistiki anlamlılık izlenmekte (D) (Ölçek çubuğu 100 µm).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kisspeptin nöronlarının arkuat çekirdek ve seksüel dimorfizm gösterecek şekilde AVPV alanlarında yerleşerek hipotalamus genelinde dağılımları olmadıkları bilinmesine rağmen aksonal uzantılarının çok farklı alanlara gittikleri bilinmektedir. Projeksiyonları ile ulaştıkları bu alanlar arasında GnRH nöronlarının bulunduğu alanlarda bulunmakta ve kisspeptin nöronlarının uzantılarının GnRH nöronları ile yakın ilişkide oldukları görülmektedir (Clarkson, & Herbison, 2006). Kisspeptin nöronlarının uzantılarının bulunduğu bir alan da medial septum/Broca'nın diagonal bandı alanıdır ki bu alanın hippokampusu olan kolinerjik ve GABAerjik projeksiyonları ile öğrenme ve hafızada rol aldığı bilinmektedir. Yine bu alanlarda fonksiyonları açıklanmayı bekleyen glutamaterjik nöronlar da bulunmaktadır (Roland ve ark., 2014). Preoptik alana infüze edilen anti rat kisspeptin antikörünün östrojen tarafından indüklenen LH pikini engellediği ve bunun endojen kisspeptinin preoptik alanda GnRH - LH salınımına östrojen aracılı pozitif feedback etkisi ile aracılık ettiği bilinmektedir (Adachi ve ark., 2007). Östradiol verilen dişilerde AVPV'deki c-Fos pozitif kisspeptin nöronlarının sabah saatlerine göre öğleden sonra anlamlı düzeyde arttığı da göstermişlerdir. Bu sabah / öğleden sonra c-Fos aktivitesindeki farklılık arkuat çekirdekte gözlemlenmemiştir. Bulgular AVPV'de kisspeptin nöronlarının GnRH/LH salınımına yol açan östrojen pozitif geribildirimının hedefi olduğunu düşündürmektedir (Adachi ve ark., 2007). Östradiolün kisspeptin aracılıklı mekanizmalar ile GnRH nöronlarına GABA ve glutamat transmisyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (Pielecka-Fortuna, & Moenter, 2010). Kiss1-Cre BAC transgenik farelerde in situ hibridizasyon tekniği ile arkuat çekirdekte kisspeptin nöronlarının %90 oranında glutamaterjik ve aynı zamanda %50 oranında GABAerjik oldukları, AVPV'de %20 oranında glutamaterjik ve aynı zamanda %75 oranında GABAerjik oldukları gösterilmiştir (Cravo ve ark., 2011). Bu bulgular ile preoptik alan ve arkuat çekirdeklerdeki kisspeptin nöronları arasında gözlemlenen farklılıkların bunların metabolizma ve üremedeki farklı rollerine ilişkin nöronal kanıtları olarak düşünülmüştür.

Arkuat çekirdekdeki kispeptin nöronlarının yoğun nöronal bağlantıları bu hücre grubunun GNRH pulsatil salınımından sorumlu olabilecek bir senkronizasyon içinde olduklarını düşündürmektedir. Maymunlarda GNRH pulsatil salınımı ile kispeptin salınımının birlikte oldukları mikrodializ yöntemi ile gösterilmiştir (Uenoyama, Pheng, Tsukamura, & Maeda, 2016). Bizim çalışmalarımız sonucunda da literatürdeki veriler ile uyumlu olarak kispeptin nöronlarının glutamat agonistleri ile aktivasyon gösterip, uygun antagonist ile baskılanabildiği morfolojik düzeyde gösterilmiş ve diğer metodlar ile elde edilen sonuçlara katkı sağladığı düşünülmüştür.

Kisseptinler konusundaki ilk verilerimiz X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde kısa bildiri olarak sunulurken sonuçları bilimsel ortamda tartışılmıştır ve verilerimiz bir derleme içerisinde yer almıştır. Ayrıca tez çalışmalarımızla paralel olarak elde ettiğimiz araştırmaların sonuçlarının bir bölümü "Glutamate and Orexin Neurons" başlığı adı altında Vitamins and Hormones'ın 89. sayısında bölüm olarak yayımlanmıştır. Çalışmalarımızdan sonuç olarak elde edilen verilere bakıldığında, nispeten daha yeni bir alan olan kispeptin nöronlarının kendi çalışmamızdaki deney hayvanı türünde elde ettiğimiz dağılım alanları, glutamaterjik sistemle olan göstermeye çalıştığımız ilişkileri yanında, bu nöronların çalışma alanımızın da ötesinde daha pek çok fonksiyonel bağlantısı ve görevi olduğunu göstermektedir.

Hipotalamusun major eksitatör amino asit nörotransmitteri olan glutamatın oreksin nöronları üzerine etkileri literatürde belirli bir oranda tartışılmıştır ve tartışılmaya devam etmektedir. Hipotalamusun oreksin içeren bölgelerinin glutamat ile stimülasyonu sonrasında, oreksin tarafından düzenlenen mekanizmalardan uyanıklığın arttığı ve REM uykusuna geçişteki bozuklukların düzeldiği görülmüş ve bunun lokal olarak glutamaterjik bir etkileşimle sağlandığı da düşünülmüştür (Alam, & Mallick, 2008; Falup-Pecurariu, Diaconu, Tint, & Falup-Pecurariu, 2021). Oreksin nöronlarının yeşil floresan protein (GFP) eksprese ettiği transgenik hayvanlarda, glutamat agonistleri AMPA veya NMDA uygulamalarının oreksin nöronlarını stimüle ettiği elektrofizyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (Li, Gao, Sakurai, & Van Den Pol, 2002; Yamakana, Muraki, Tsujino, Goto, & Sakurai, 2003). Benzer şekilde metabotropik glutamat reseptör agonisti uygulamasının, oreksin nöronlarının

aktivasyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Acuna-Goycolea, Li, & Van Den Pol, 2004). Glutamaterjik nöronların işaretleyicisi olarak kullanılan VGluT proteinlerinin varlığının oreksin nöronlarıyla sinaptik temasta olan glutamaterjik akson sonlanmalarında gösterilmesi, oreksin nöronlarının glutamat tarafından regülasyonunu destekleyen diğer bulgulardır (Henny, & Jones, 2006; Li ve ark., 2002).

Çalışmalarımızda oreksin nöronlarının glutamaterjik etkileşimi, morfolojik yaklaşımla, histolojik teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle laboratuvarımızda oreksin nöronların işaretlenebilirliği immünohistokimya tekniği ve ilgili antikorların kullanımıyla belirlenmiştir. Takiben c-Fos proteini varlığının nöronal aktivasyon belirteci olması özelliğinden yararlanılarak, ikili immünohistokimya tekniği ile oreksin nöronlarının glutamat agonistlerinin uygulanması sonrasında aktive olup olmadıkları ve olası aktivasyonun glutamat antagonistleri ile bloklanıp bloklanmadığı araştırılmıştır. Literatürde veziküler glutamat taşıyıcı proteinlerden VGluT2 içeren aksonlarla olan teması gösterilen oreksin nöronlarında bu ilişki doğrulanmaya çalışılmış ve ayrıca VGluT1 ve VGluT3 içeren akson sonlanmalarıyla olası irtibatları belirlenmiştir. Literatürde oreksin nöronlarının glutamaterjik uyarıları alması için gerekli olan glutamat reseptörleri eksprese ettiklerine dair bir bilgi yoktur. Bu tez kapsamında ikili boyama tekniği ile çeşitli glutamat reseptör alt birimlerinin oreksin nöronlarında ekspresyonunu belirleyecek çalışmalar yapılmıştır. Tez çalışmalarından elde edilen sonuçlar oreksin nöronlarının glutamat tarafından hem dolaylı hem de direkt olarak kontrol edilebileceğine dair kanıtlar sağlamıştır. Çalışmalarımızda oreksin nöronlarında fonksiyonel glutamat reseptörlerinin var olduğu hipotezi, immünohistokimyanın farklı yaklaşımları kullanılarak desteklenmeye çalışılmış ve öncelikli olarak oreksin nöronlarının tümünün belirlenmesinde prepro-oreksin antikorı kullanılarak yapılan boyamalarda, oreksin nöronlarının hipotalamusta dağılımı belirlenmiştir.

Çalışmalarımızda kullanılan anti-prepro-oreksin antikorı, prepro-oreksinin hem Oreksin A hem de Oreksin B'nin prekürsörü olması nedeniyle, tüm oreksin nöronlarını işaretlemektedir. Beklenilenden daha konsantre solüsyonla çalışılması gerekmesine rağmen anti prepro-oreksin antikorı, literatürde rapor edilen oreksin

nöron dağılım paternini teyit etmiştir (Peyron ve ark., 1998). Benzer şekilde oreksin A antikoruyla yaptığımız daha ileri çalışmalar da literatüre uyumlu sonuçlar alınmıştır. Verilerimizde oreksin nöronlarının çoğunlukla lateral hipotalamusta yerleştiği, forniks çevresinde yoğunlaşacak şekilde lokalize olduğu ve daha az sayıda nöronların lateral hipotalamusun rostral ve kaudal uçlarına kadar yayıldığı belirlenmiştir.

Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda c-Fos içeren nöronların %35 gibi yüksek bir oranda görülmesi, bu nöronların bir bölümünün devamlı aktivasyon gösterdiğini, oreksinin uyanıklık düzenleniminde de rol aldığı göz önünde tutulduğunda, bunun beklenen bir sonuç olduğunu düşündürmüştür. Literatürdeki oreksinlerin keşfi ile yapılan raporlarda da kontrol gruplarında benzer yüksek yüzdeler bulunması, sonuçlarımızı desteklemektedir (Estabrooke ve ark., 2001). Kainik asit veya AMPA uygulamasıyla c-Fos içeren yani aktive olan nöron sayısındaki yaklaşık bir kat artma bu nöronların glutamaterjik etkilenime açık olduğunu başka bir deyişle fonksiyonel AMPA / kainik asit reseptörleri içerdiğini göstermesi bakımından önemli bulunmuştur. Ayrıca c-Fos eksprese eden oreksinerjik nöronların VGluT içeren sonlanmalarla temasta olmaları, glutamaterjik sistemin direkt olarak oreksin nöronlarını etkileyebileceğini göstermesi açısından önem taşımaktadır. Glutamatın oreksin nöronları üzerindeki etkileri elektrofizyolojik çalışmalarla da gösterilmiştir. Oreksin nöronlarında GFP proteini işaretleyici olarak sürekli eksprese eden transgenik farelerde yapılan deneylerde, AMPA'nın bu nöronların depolarizasyonuna neden olduğu da gösterilmiştir (Yamakana ve ark., 2003).

Literatürdeki bu çalışmalarda ayrıca oreksin nöronlarında NMDA etkileri de gösterilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda NMDA uygulamasının aktive olan nöron sayısını arttırmadığı belirlenmiştir. Bilgiler arasındaki bu farklılık, kullanılan yaklaşımlardan kaynaklanıyor olabileceğini ya da daha ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini düşündürmüştür.

Oreksin nöronlarının aktivasyonunun non-NMDA antagonisti CNQX ile baskılanması da oreksin nöronlarında fonksiyonel glutamat reseptörlerini varlığını

düşündürmektedir. Burada ortaya çıkan önemli soru glutamatın etkilerini direk mi yoksa indirekt olarak internöronlar aracılığıyla mı gösteriyor olduğudur.

Vazopressin açısından da tez çalışmaları sonunda elde edilen bulgular, vazopressinerjik sistem üzerinde glutamat etkilerinin belirlenmesinde hem literatürdeki bilgileri destekleyen ek sonuçlar çıkarmış hem de yeni bilgiler ortaya koymuştur. Vazopressin nöronlarını belirlemede kullandığımız antikorlar literatür bilgilerine uygun sonuçlar vermiştir. Bu antikorlar, SON ve PVN’de işaretlediğimiz ve literatür bilgileriyle aynı sonuç veren vazopressin nöronlarını, aynı çekirdeklerde komşu oksitosin nöronlarından spesifik olarak ayrı boyamaktadır. Vazopressinerjik sistem üzerindeki glutamat etkileri çeşitli çalışmalarda tanımlanmıştır. Glutamaterjik nöronların SON magnosellüler nöronlarına projekte oldukları ve retrograd olarak işaretlenen bu glutamat nöronlarının hipotalamus içerisinde farklı alanlarda bulundukları bilinmektedir (Csaki ve ark., 2002). Çalışmalarımızda vazopressin nöronlarının VGluT2 ve VGluT3 içeren glutamaterjik nöronlar tarafından innerve edildikleri gösterilmiştir. Vazopressin nöronlarının her üç glutamat agonisti uygulamasına da aktivasyon yanıtı verdiği de görülmüştür. Bu aktivasyonun uygun antagonistin ön uygulamasıyla kısmen baskılandığı bulunmuştur. SON’daki glutamaterjik etkinin vazopressin ve oksitosin salınımının otoregülasyonu altında olduğunu düşündürecek bulgular da literatürde mevcuttur (Curras-Collazo, Gillard, Jin, & Pandika, 2003).

Kainik asidin de benzer etkilere sahip olduğu hipotalamik dilimlerde yapılan “in vitro” çalışmalarda gösterilmiştir (Meeker, Curras, Stewart, Serje, & Al-Ghoul, 1999). c-Fos immünokimyası ile yapılan ve vazopressin nöronlarında glutamat agonistlerinin aktive edici etkilerini gösteren çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular, literatürdeki bu bilgileri histolojik düzeyde destekleyen ilk verilerdir. Bu veriler ışığında, agonist etkisiyle periferde görülen vazopressin hormonu artışından agonistlerle aktive olan bir grup vazopressin nöronunun sorumlu olduğu düşünülebilir.

Oreksin nöronları açısından bakıldığında özet olarak, bu nöron grubunun, glutamaterjik inervasyon aldığı, AMPA ve kainik asit reseptör altbirimlerini eksprese

ettikleri ve non-NMDA agonistleri ile aktivasyon gösterip, uygun antagonist ile baskılanabildiği anlaşılmaktadır. Bu sonuçlar ışığında, oreksin nöron fonksiyonunun düzenlenmesinde glutamatın önemli bir nörotransmitter olduğu ve etkisini non-NMDA glutamat reseptörleri aracılığı ile gösterdiği düşünülmektedir.

Vazopresinerjik sistem açısından da vazopressin nöronları üzerinde glutamat agonistlerinin uyarıcı etkileri olduğu, glutamatın etkisini vazopressin nöronlarında sentezlendiğini tespit ettiğimiz reseptörler aracılığı ile yaptığı gösterilmiş ve daha ileri çalışmalarımız için bu sonuçların ışık tutucu ve yol gösterici olduğu da düşünülmüştür.

Tez çalışmalarının sonucu olarak hipotalamusta yerleşik nöroendokrin nöronların regülasyonunda glutamaterjik sistemin rol oynadığı belirlenmiştir. Glutamati nörotransmitter olarak kullanan nöronların hipotalamik nöroendokrin sistemlere periferden gelen sinyalleri iletiyor olmanın yanı sıra merkezi sinir sisteminin üst merkezlerinden gelen uyarıları direkt olarak hipotalamik nöronlara taşıyor olabileceği düşünülmüştür. Bu sonuçlar kapsamında tez çalışmalarına konu olan nöronlar dışında diğer nöroendokrin sistemlerin de glutamaterjik regülasyon açısından incelenmesi önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acuna-Goycolea, C., Li, Y., & Van Den Pol, A.N. (2004). Group III Metabotropic Glutamate Receptors Maintain Tonic Inhibition of Excitatory Synaptic Input to Hypocretin/Orexin Neurons. *Journal of Neuroscience*, 24, 3013-22; doi: 10.1523/JNEUROSCI.5416-03.2004.
- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., ... Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *Journal of Reproduction and Development*, 53:367-78; doi: 10.1262/jrd.18146.
- Alam, M.A., & Mallick, B.N. (2008). Glutamic Acid Stimulation of the Perifornical-Lateral Hypothalamic Area Promotes Arousal and Inhibits Non-REM/REM Sleep, *Neuroscience Letters*, 439, 281-6; doi: 10.1016/j.neulet.2008.05.042.
- Backholer, K., Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., Li, Q., Clarke, I.J. (2010). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology*, 151:2233-43; doi: 10.1210/en.2009-1190.
- Bettler, B., & Mulle, C. (1995). Review: neurotransmitter receptors. II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 34(2):123-39; doi: 10.1016/0028-3908(94)00141-e.
- Braak, H., & Braak, E. (1992). Anatomy of the human hypothalamus (chiasmatic and tuberal region). *Progress in Brain Research*, 93:3-14; doi: 10.1016/s0079-6123(08)64559-8.
- Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Ohsawa, M., Yin, D., Yang, J., Chang, J.K., ... Dun, N.J. (2005). KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*, 481:314-29; <https://doi.org/10.1002/cne.20350>.
- Brann DW. (1995). Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, 1995;61:213-225; doi: 10.1159/000126843.
- Brann, D.W., Mahesh, V.B. (1994). Excitatory amino acids: function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15(1):3-49; doi: 10.1006/frne.1994.1002.
- Briggs, S.B., Hannapel, R., Ramesh, J., & Parent, M.B. (2021). Inhibiting ventral hippocampal NMDA receptors and Arc increases energy intake in male rats. *Learning & Memory*. 19;28(6):187-194. doi: 10.1101/lm.053215.120.
- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Saïd, S., Morrissey, A., Cognie, J., ... Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and

- causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology*, 148(11):5258-67. doi: 10.1210/en.2007-0554.
- Cerrato, F., Shagoury, J., Kralickova, M., Dwyer, A., Falardeau, J., Ozata, M., ... Seminara, S.B. (2006). Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *European Journal of Endocrinology*, 155 Suppl 1:S3-S10. doi: 10.1530/eje.1.02235.
- Chan, Y.M., Broder-Fingert, S., Seminara, S.B. (2009). Reproductive functions of kisspeptin and Gpr54 across the life cycle of mice and men. *Peptides*, 30:42–8; doi: 10.1016/j.peptides.2008.06.015;
- Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., ... Yanagisawa, M. (1999). Narcolepsy in Orexin Knockout Mice: Molecular Genetics of Sleep Regulation. *Cell*, 98, 437-51; [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81973-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81973-X).
- Chen, P.E., Geballe, M.T., Stansfeld, P.J., Johnston, A.R., Yuan, H., Jacob, A.L., ..., Wyllie, D.J. (2005). Structural features of the glutamate binding site in recombinant NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors determined by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Molecular Pharmacology*, 67 (5): 1470–84; doi:10.1124/mol.104.008185.
- Clarke, I.J., & Caraty, A. (2013). Kisspeptin and seasonality of reproduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 784:411-30; doi: 10.1007/978-1-4614-6199-6199.
- Clarke, P.B., & Reuben, M. (1995). Inhibition by dizocilpine (MK-801) of striatal dopamine release induced by MPTP and MPP+: possible action at the dopamine transporter. *British Journal of Pharmacology*, 114 (2): 315–22; doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb13229.x.
- Clarkson, J., Herbison, A.E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147:5817–25; doi: 10.1210/en.2006-0787.
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A., Herbison, A.E. (2009). Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 21:673–82; doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x.
- Clements, M.A., Swapna, I., & Morikawa, H. (2013). Inositol 1,4,5-triphosphate drives glutamatergic and cholinergic inhibition selectively in spiny projection neurons in the striatum. *Journal of Neuroscience*, 33(6):2697-708; doi: 10.1523/JNEUROSCI.4759-12.2013.

- Cluderay, J.E., Harrison, D.C., & Hervieu, G.J. (2002). Protein Distribution of the Orexin-2 Receptor in the Rat Central Nervous System *Regulatory Peptides*, 104, 131-44; doi: 10.1016/s0167-0115(01)00357-3.
- Colledge, W.H. (2004). GPR54 and puberty. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(9):448-53. doi: 10.1016/j.tem.2004.09.008.
- Colledge, W.H. (2008). GPR54 and kisspeptins. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 46:117-43; doi: 10.1007/400_2007_050.
- Colledge, W.H. (2009). Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 20(3):115-21. doi: 10.1016/j.tem.2008.10.005.
- Conn, P.M. (2008). *Neuroscience in medicine: Third edition*. doi:10.1007/978-1-60327-455-5. New Jersey: Humana Press.
- Cravo, R.M., Margatho, L.O., Osborne-Lawrence, S., Donato, J., Atkin, S., Bookout A.L., ... Elias, C.F. (2011). Characterization of Kiss1 neurons using transgenic Mouse models. *Neuroscience*, 26;173:37-56; DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.022.
- Csaki, A., Kocsis, K., Kiss, J., & Halasz, B. (2002). Localization of Putative Glutamatergic/Aspartatergic Neurons Projecting to the Supraoptic Nucleus Area of the Rat Hypothalamus. *European Journal of Neuroscience*, 16, 55-68; doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02059.x.
- Cunningham, E.T., & Sawchenko, P.E. (1991). Reflex Control of Magnocellular Vasopressin and Oxytocin Secretion. *Trends in Neuroscience*, 14, 406-11; doi: 10.1016/0166-2236(91)90032-p.
- Curras-Collazo, M.C., Gillard, E.R., Jin, J., & Pandika, J. (2003). Vasopressin and Oxytocin Decrease Excitatory Amino Acid Release in Adult Rat Supraoptic Nucleus, *Journal of Neuroendocrinology*, 15, 182-90; doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.00976.x.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B., Colledge, W.H. (2008). Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology*, 149:3926-32; doi: 10.1210/en.2007-1487.
- Decourt, C., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., Briant, C. (2008). Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 36:131-7; doi: 10.1016/j.jchemneu.2008.07.008.
- De Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, ... Sutcliffe, J.G. (1998). The Hypocretins:Hypothalamus-Specific Peptides With

- Neuroexcitatory Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 322-7; <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322>.
- De Vries, G.J., & Miller, M.A. (1998). *Anatomy and Function of Extrahypothalamic Vasopressin Systems in the Brain*, in *Advances in Brain Vasopressin*. Amsterdam; Elsevier.
- Dhillon, W.S. (2008). Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(8):963-70. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01753.x.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51 (1): 7–61.
- Dingledine, R. (2012). Glutamatergic Mechanisms Related to Epilepsy: Ionotropic Receptors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (4. baskı) içinde. US: National Center for Biotechnology Information.
- Eyigör, O., Centers, A.P., & Jennes, L. (2001). Distribution of Ionotropic Glutamate Receptor Subunit MRNAs in the Rat Hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 434, 101-24; doi: 10.1002/cne.1167.
- Eyigor, O., Minbay, Z., Cavusoglu, I. (2010). Activation of orexin neurons through non-NMDA glutamate receptors evidenced by c-Fos immunohistochemistry. *Endocrine*. 2010 Feb;37(1):167-72. doi: 10.1007/s12020-009-9284-x.
- Estabrooke, I.V., McCarthy, M.T., Ko, E., Chou, T.C., Chemelli, R.M., Yanagisawa, ..., Scammell, T.E. (2001). Fos Expression in Orexin Neurons Varies With Behavioral State. *Journal of Neuroscience*, 21, 1656-62; doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-05-01656.2001.
- Falup-Pecurariu C., Diaconu Ș., Țiț D., & Falup-Pecurariu O. (2021). Neurobiology of sleep (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(3):272. doi: 10.3892/etm.2021.9703.
- Ferguson, A.V., & Samson, W.K. (2003). The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3):141-50; doi: 10.1016/s0091-3022(03)00028-1.
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neuroscience Letters*, 401:225–30: doi: 10.1016/j.neulet.2006.03.039.
- Foster, A.C., & Fagg, G.E. (1987). Neurobiology. Taking apart NMDA receptors". *Nature* 329 (6138): 395–6. doi:10.1038/329395a010.1038/329395a0.
- Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., ...Gustafson, E.L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the

- development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312:1357-1363; doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.066.
- Gainer, H., & Wray, S. (1992). Oxytocin and Vasopressin. From Genes to Peptides. *Annals of the New York Academy of Sciences Journal*, 652:14-28; doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb34342.x.
- Gottsch, M.L., Cunningham M.J., Smith J.T., Popai S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., ... Steiner, R.A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145:4073-7; doi: 10.1210/en.2004-0431.
- Gottsch, M.L., Clifton, D.K., & Steiner, R.A. (2009). From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30:4-9; doi: 10.1016/j.peptides.2008.06.016.
- Grumbach, M.M. (2002). The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Hormone Research*, 57:2-14; doi: 10.1159/000058094.
- Henny, P., & Jones, B.E. (2006). Innervation of Orexin/Hypocretin Neurons by GABAergic, Glutamatergic or Cholinergic Basal Forebrain Terminals Evidenced by Immunostaining for Presynaptic Vesicular Transporter and Postsynaptic Scaffolding Proteins. *Journal of Comparative Neurology*, 499, 645-61; doi: 10.1002/cne.21131.
- Herbison, A.E. (2006). *Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd edition.* USA; Academic Press.
- Herbison, A.E. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Research Review*, 57:277-87.
- Hofmann, H.A. (2006). Gonadotropin-releasing hormone signaling in behavioral plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 16:343-50; doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.006.
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 17: 31-108. [https://doi.org/ 10.1146/annurev.ne.17.030194.000335](https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.000335).
- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., & Diano, S. (2009). Fuel Utilization by Hypothalamic Neurons: Roles for ROS. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.003>.
- Howe, J.R. (1996). Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *Journal of Neurophysiology*, 76:510-519; doi: 10.1152/jn.1996.76.1.510.

- Iravani, M.M., Muscat, R., & Kruk, Z.L. (1999). MK-801 interaction with the 5-HT transporter: a real-time study in brain slices using fast cyclic voltammetry. *Synapse*, 32 (3): 212–24. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(19990601)32:3<212::AID-SYN7>3.0.CO;2-M.
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., ... Steiner, R.A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80(4):264-72; DOI: 10.1159/000083140.
- Jayasena, C.N., Dhillon, W.S., & Bloom, S.R. (2008). Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. *Peptides*, 30(1):76-82. doi: 10.1016/j.peptides.2008.06.026.
- Jayasena, C.N., Nijher, G.M., Comminos, A.N., Abbara, A., Januszewski, A., Vaal, M.L., ... Dhillon, W.S. (2011). The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(12):E1963-72. doi: 10.1210/jc.2011-1408.
- Johnson, A.K. (1985). The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural systems involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Research Bulletin*, 15(6):595-601. doi: 10.1016/0361-9230(85)90209-6.
- Kafa, I.M., Eyigör, O. (2011). Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 37 (1) 53-60.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., & Hudspeth, A.J. (2013). *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill.
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., ... Tena-Sempere, M. (2007). Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology*, 148:1774–83; DOI: 10.1210/en.2006-1540.
- Korf, H.W., & Moller, M. (2021). Arcuate nucleus, median eminence, and hypophyseal pars tuberalis. *Handbook of Clinical Neurology*, 180:227-251. doi: 10.1016/B978-0-12-820107-7.00015-X.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., ... Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37):34631-6. doi: 10.1074/jbc.M104847200.

- Kuohung, W., & Kaiser, U.B. (2006). GPR54 and KiSS-1: Role in the regulation of puberty and reproduction. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 7(4):257-63; DOI: 10.1007/s11154-006-9020-2.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., & Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88:1731–7; DOI: 10.1093/jnci/88.23.1731.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard AD, ... , O'Dowd, B.F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Letters*, 5;446(1):103-7. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00009-5.
- Lemaire, L.A., Cao, C., Yoon, P.H., Long, J., & Levine, M. (2021). The hypothalamus predates the origin of vertebrates. *Science Advances*, 28;7(18):eabf7452; doi:10.1126/sciadv.abf7452.
- Li, Y., Gao, X.B., Sakurai, T., & Van Den Pol, A.N. (2002). Hypocretin/Orexin Excites Hypocretin Neurons Via a Local Glutamate Neuron-A Potential Mechanism for Orchestrating the Hypothalamic Arousal System. *Neuron*, 36, 1169-81; DOI: 10.1016/s0896-6273(02)01132-7.
- Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., Motta, M. (2004). The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(4):279–95; DOI: 10.1016/j.yfrne.2003.10.003.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X., ... Mignot, E. (1999). The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the Hypocretin (Orexin) Receptor 2 Gene. *Cell*, 98, 365-76; DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81965-0.
- Liu, X. Lee, K., Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology*, 149(9):4605-14; DOI: 10.1210/en.2008-0321.
- Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K. (2001). Differential Expression of Orexin Receptors 1 and 2 in the Rat Brain, *Journal of Comparative Neurology*, 435, 6-25; DOI: 10.1002/cne.1190.
- Marcus, J.N., Elmquist, J.K. (2006). *Orexin Projections and Localization of Orexin Receptors, in The Orexin/Hypocretin System: Physiology and Pathophysiology*, Totowa; Humana Press.

- Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A., & Costa, E. (1989). Delayed increase of Ca^{++} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Molecular Pharmacology*, 36(1):106-112.
- Mayer, M.L. (2005). Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron*, 45 (4): 539–52; doi:10.1016/j.neuron.2005.01.031.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., & Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320:383–8; DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.185.
- Meeker, R.B., Curras, M.C., Stewart, J., Serje, A., & Al-Ghoul, W. (1999). Functional Activation of Punch-Cultured Magnocellular Neuroendocrine Cells by Glutamate Receptor Subtypes. *Journal of Neuroscience Methods*, 89, 57-67; DOI: 10.1016/s0165-0270(99)00042-4.
- Meister, B. (2007). Neurotransmitters in Key Neurons of the Hypothalamus That Regulate Feeding Behavior and Body Weight. *Physiology & Behavior*, 92, 263-71; DOI: 10.1016/j.physbeh.2007.05.021.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., ...Aparicio, S.A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:1761–6; DOI: 10.1073/pnas.0409330102.
- McEntee, W. & Crook, T. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology*, 111 (4): 391–401; doi:10.1007/BF02253527.
- Michael, A.P. (2015). *Neuroscience: Exploring the Brain, Fourth Edition*. Boston: Jones & Bartlett Learning.
- Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V. (2009). The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides*, 30(1):26-33; DOI: 10.1016/j.peptides.2008.09.004.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., & Seeburg, P.H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, 22;256(5060):1217-21; DOI: 10.1126/science.256.5060.1217.
- Mori, H., & Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology*, 34(10):1219-37; DOI: 10.1016/0028-3908(95)00109-j.
- Morsette, D.J., Swenson, K.L., Badre, S.E., & Sladek, C.D. (1998). Regulation of vasopressin release by ionotropic glutamate receptor agonists. *Advances in*

- Experimental Medicine and Biology*, 449:129-30; DOI: 10.1007/978-1-4615-4871-3_14.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., ... Harrison, D.C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276:28969–75; DOI: 10.1074/jbc.M102743200.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., ... Tena-Sempere, M. (2005). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 146:1689–97; DOI: 10.1210/en.2004-1353.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., ... Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 31;411(6837):613-7. doi: 10.1038/35079135.
- Onaka, T., & Yagi, K. (2000). Involvement of N-methyl-D-aspartic acid receptor activation in oxytocin and vasopressin release after osmotic stimuli in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(2):166-74; DOI: 10.1046/j.1365-2826.2001.00607.x.
- Paxinos, G., & Watson C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Academic Press.
- Pak, C.W., & Curras-Collazo, M.C. (2002). Expression and Plasticity of Glutamate Receptors in the Supraoptic Nucleus of the Hypothalamus. *Microscopy Research and Technique*, 56, 92-100; DOI: 10.1002/jemt.10017.
- Peyron, C., Tighe, D.K., Van Den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., & Kilduff, T.S. (1998). Neurons Containing Hypocretin (Orexin) Project to Multiple Neuronal Systems. *Journal of Neuroscience*, 18, 9996-10015; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998.
- Pielecka-Fortuna, J., & Moenter, S.M. (2010). Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology*, 151(1):291-300; DOI: 10.1210/en.2009-0692.
- Plant, T.M. (2006). The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *European Journal of Endocrinology*, 155:11–6; DOI: 10.1530/eje.1.02232.
- Plant, T.M. (2015). The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Journal of Endocrinology*, 226(2):T41-54. doi: 10.1530/JOE-15-0113.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S., McNamara, J.O., & Williams, S.M. (2004). *Neuroscience 3rd edition*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

- Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K.M., Clarke, I.J. (2006). Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology*, 147:804–10; DOI: 10.1210/en.2005-1123.
- Roland J.J., Stewart A.L., Janke K.L., Gielow M.R., Kostek J.A., ..., Pang K.C. (2014) Medial septum-diagonal band of Broca (MSDB) GABAergic regulation of hippocampal acetylcholine efflux is dependent on cognitive demands. *Journal of Neuroscience*, 2014 Jan 8;34(2):506-14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2352-13.2014.
- Rogol, A.D. (2004). Gender and hormonal regulation of growth. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 17:1259-65.
- Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L., Rance, N.E. (2007). Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92:2744–50; DOI: 10.1210/jc.2007-0553.
- Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19):10972-6; doi: 10.1073/pnas.1834399100.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., ... Yanagisawa, M.. (1998). Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors That Regulate Feeding Behavior. *Cell*, 92, 573-85; DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80949-6.
- Schmitz, D., Mellor, J., & Nicoll, R.A. (2001). Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science*, 291 (5510): 1972–6; doi:10.1126/science.1057105.
- Seminara, S.B., & Crowley, W.F. (2008). Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6):727-31; doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01731.x.
- Seminara, S.B. (2005). Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: Critical pathway modulating GnRH secretion. *Frontiers Neuroendocrinology*, 26:131-8; <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.001>.
- Seminara, S.B., Dipietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, W.F., Plant, T.M. (2006). Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*, 147:2122–6; DOI: 10.1210/en.2005-1550.
- Seminara, S.B., Messager, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., ... Colledge, W.H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of

- puberty. *The New England Journal of Medicine*, 23;349(17):1614-27; doi: 10.1056/NEJMoa035322.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., Plant, T.M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(6):2129-34; doi: 10.1073/pnas.0409822102.
- Shigeri, Y., Seal, R.P., & Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Research*, 45 (3): 250–65; doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.04.004.
- Shirasaka, T., Kunitake, T., Takasaki, M., & Kannan, H. (2002). Neuronal effects of orexins: relevant to sympathetic and cardiovascular functions. *Regulatory Peptides*, 15;104(1-3):91-5; DOI: 10.1016/s0167-0115(01)00352-4.
- Simonneaux, V., Ansel, L., Revel, F.G., Klosen, P., Pévet, P., Mikkelsen, J.D. (2009). Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides*, 30:146–53; DOI: 10.1016/j.peptides.2008.06.006.
- Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (2006). KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *Journal of Neuroendocrinology*, 18:298–303; DOI: 10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x.
- Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A., Clarke, I.J. (2009). Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 150:5530–8; DOI: 10.1210/en.2009-0712.
- Spinazzi, R., Andreis, P.G., Rossi, G.P., & Nussdorfer, G.G. (2006). Orexins in the Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Pharmacological Reviews*, 58, 46-57; DOI: 10.1124/pr.58.1.4.
- Stanley, B.G., Willett, V.L., Donias, H.W., Dee, M.G., & Duva, M.A. (1996). Lateral hypothalamic NMDA receptors and glutamate as physiological mediators of eating and weight control. *American Physiological Society Journal*, 270(2 Pt 2):R443-9; doi: 10.1152/ajpregu.1996.270.2.R443.
- Stenberg, D. (2007). Neuroanatomy and Neurochemistry of Sleep. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1187-204; DOI: 10.1007/s00018-007-6530-3.
- Teles, M.G., Bianco, S.D., Brito, V.N., Trarbach, E.B., Kuohung, W., Xu, S., Seminara, S.B., ... Latronico, A.C. (2008). A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *The New England Journal of Medicine*, 358:709–15; DOI: 10.1056/NEJMoa073443.
- Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Bewick, G.A., Stamp, G.W., Curtis, A.E., ... Bloom, S.R. (2006). Chronic subcutaneous administration of kisspeptin54

- causes testicular degeneration in adult male rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291:1074–82; DOI: 10.1152/ajpendo.00040.2006.
- Uenoyama Y., Pheng V., Tsukamura H., & Maeda K.I. (2016). The roles of kisspeptin revisited: inside and outside the hypothalamus. *Journal of Reproduction and Development*. 2016 Dec 20;62(6):537-545; doi: 10.1262/jrd.2016-083.
- Van Den Pol, A.N., & Trombley, P.Q. (1993). Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *Journal of Neuroscience*, 13;2829–2836; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-07-02829.1993.
- Van Den Pol, A.N., Hermans-Borgmeyer, I., Hofer, M., Ghosh, P., & Heinemann, S. (1994). Ionotropic Glutamate-Receptor Gene Expression in Hypothalamus: Localization of AMPA, Kainate, and NMDA Receptor RNA With in Situ Hybridization. *Journal of Comparative Neurology*, 343, 428-44; DOI: 10.1002/cne.903430307.
- von Bohlen und Halbach, O., & Dermietzel, R. (2006). *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects*. Weinheim; Wiley-VCH.
- Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., & Yanagisawa, M. (2001). To Eat or to Sleep? Orexin in the Regulation of Feeding and Wakefulness. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 429-58; DOI: 10.1146/annurev.neuro.24.1.429.
- Wolosker, H. (2006). D-serine regulation of NMDA receptor activity. *Science, STKE* pe41 (356): 1–3; doi:10.1126/stke.3562006pe41.
- Xie, X., Crowder, T.L., Yamanaka, A., Morairty, S.R., Lewinter, R.D., Sakurai, T., Kilduff, T.S. (2006). GABA(B) Receptor-Mediated Modulation of Hypocretin/Orexin Neurons in Mouse Hypothalamus. *Journal of Physiology*, 574, 399-414; doi: 10.1113/jphysiol.2006.108266.
- Xie, Q., Kang, Y., Zhang, C., Xie, Y., Wang, C., Liu, J., Yu, C., Zhao, H., & Huang, D. (2022). The Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 28;13:925206; doi:10.3389/fendo.2022. 925206.9_19.
- Yamakana, A., Muraki, Y., Tsujino, N., Goto, K., & Sakurai, T. (2003). Regulation of Orexin Neurons by the Monoaminergic and Cholinergic Systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 120-9; DOI: 10.1016/s0006-291x(03)00299-7.
- Yamanaka, A. (2006). *Afferent System of Orexin Neurons, in The Orexin/Hypocretin System: Physiology and Pathophysiology*. Totowa; Humana Press.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazolepropionat

AVPV: Anteroventral Periventriküler Çekirdek

CNQX: 6 – Cyano – 7 –Nitroquinoxaline - 2,3 - Dione

DAB: 3,3' - Diaminobenzidine

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

GABA: Gamma Aminobütirik asit

GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

GnRHR: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon Reseptörü

GPRC: G Proteinleri ile Çalışan Reseptörler

HHG: Hipotalamo Hipofizer Gonadal

IP: İntraperitoneal

LH: Luteinleştirici Hormon

NMDA: N-metil-D-aspartat

OVLT: Organum Vasculosum Lamina Terminalis

PFA: Paraformaldehit

PVN: Paraventriküler Çekirdek

SCN: Suprakiazmatik Çekirdek

SON: Supraoptik Çekirdek

8. EKLER

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN BAKIM VE KULLANIM KOMİTESİ

19. 04. 2005

Sayın Yard. Doç. Özhan Eyigör

Projeniz, komitemiz tarafından görüşülerek uygun bulunmuştur. Karar eklidir. Çalışmanın projede belirtilen ve komitemizce uygun bulunan deney protokolüne göre yürütülmesi esastır. Çalışmanın yürütülmesi aşamasında deney protokolünde değişiklik yapmak zorunluluğu ortaya çıkarsa, bu değişiklikler için uygulamaya geçmeden önce komitemizin bilgilendirilerek izin alınması gerektiğini hatırlatır, proje süresince çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Eki: Bir adet Komite karar örneği.

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN BAKIM VE KULLANIM KOMİTESİ

TOPLANTI TARİHİ: 19. 04. 2005

KARAR NO: 19. 04. 2005/1

PROJE BAŞVURUSUN BAŞLIĞI: Hipotalamik nöroendokrin nöronların düzenlenmesinde glutamaterjik sistemlerin rolü

PROJE SORUMLUSU: Yard. Doç. Dr. Özhan Eyigör

KARAR: Yukarıda başlığı ve yürütücüsü belirtilen proje, Uludağ Üniversitesinde Hayvanların Kullanım ve Bakım Komitesi Yönergesi ile Uluslararası geçerli kılavuz hükümlerine göre değerlendirilmiş olup, komitemizce uygun bulunmuştur.

KOMİTE ÜYELERİ

Prof. Dr. İsmail H. Ulus (Başkan)

Prof. Dr. İsmet Kan

Prof. Dr. Kasım Özlük

Prof. Dr. Suna Gedikoğlu

Prof. Dr. Levent Büyükuysal

Prof. Dr. Müfit Kahraman

Prof.Dr. Nusret Korun

Dr. Füsün Kalaycı

9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimin boyunca bilgisini, ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen doktora danışmanım Prof. Dr. Özhan Eyigör'e katkıları, yardımları ve yol göstericiliği için en başta teşekkür ederim. Titiz ve ilkeli davranışları, bilimsel bakış açısı ve deneyimleri ile şahsıma, tez çalışmama ve diğer çalışmalarına katkısı büyüktür. Yine doktora eğitimim boyunca hem ders aşamasında hem de tez döneminde yardımlarını, gülümser yüzlerini, bilimsel birikimlerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Dalı Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. Semiha Ersoy, Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu, Prof. Dr. Şahin Sırmalı, Prof. Dr. Zehra Minbay, Dr. Öğr. Üyesi Duygu Gök Yurtseven de teşekkürlerimden çok daha fazlasını haketmektedirler. Ayrıca tez çalışmalarımın bir kısmının HDP(T)-2010/25 nolu proje kapsamında desteklenmesini sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi BAP komisyonuna teşekkür ederim. Tüm çalışmalarında desteklerini her zaman aldığım Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, Tıp Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, fakültemizde disiplinler arası ortak çalışmalar yaptığımız ve bilgi paylaşımında bulunduğumuz tüm Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerine, öğrencilerime, aileme ve hep yanımda olan eşim Sezer Erer Kafa'ya teşekkürü borç bilirim.

10. ÖZGEÇMİŞ

İlkokulu Yalova Atatürk (∞) İlköğretim Okulunda, ortaokul ve liseyi Yalova Lisesinde okudum. 1999 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum ve 2001 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalında uzmanlık eğitime başladım. 2006 yılında uzmanlığımı tamamlayarak Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında göreve başladım. Anatomi Anabilim Dalındaki görevim devam ederken Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitime başladım. 2011 yılında yardımcı doçent kadrosuna atandım ve 2013 yılında doçent oldum. 2017 yılında aynı zamanda Tıp Eğitimi Anabilim Dalına da öğretim üyesi olarak görevlendirildim ve bu görevim de hala devam etmektedir. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde farklı kademelerde eğitim ve öğretim ile alakalı kurul ve komisyonlardaki görevlerim devam etmektedir. Anatomi ve Tıp Eğitimi Dallarında önlisans, lisans ve lisansüstü düzeylerinde ders vermekteyim. Bilimsel çalışmalarım sinirbilim, gross anatomi, klinik anatomi, histoloji ve tıp eğitimi alanlarına yöneliktir. Morfometrik ölçümler, histokimya, immünohistokimya teknikleri kullanarak osteolojik ve dokusal morfometrik yaklaşımlar, adli tıp konuları, sinir sistemini etkileyen hastalıklardaki yapısal ve hücrel değişimler bilimsel ilgi alanlarım arasındadır.