



T.C.

KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEÇ PREPUBERTAL DÖNEMDEKİ DİŞİ KÖPEKLERDE
DESLORELİN İMPLANT UYGULAMALARINI TAKİBEN
OVARYUM ve UTERUSTA GnRH ve KİSSPEPTİN RESEPTÖR
EKSPRESYONU**

Arş. Gör. Muhammet Ali KARADAĞ

DOKTORA TEZİ

I. DANIŞMAN

Prof. Dr. Duygu KAYA

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Bülent POLAT

2023 – KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

**GEÇ PRE-PUBERTAL DÖNEMDEKİ DIŞI KÖPEKLERDE
DESLORELİN İMPLANT UYGULAMALARINI TAKİBEN
OVARYUM ve UTERUSTA GnRH ve KİSSPEPTİN RESEPTÖR
EKSPRESYONU**

Arş. Gör. Muhammet Ali KARADAĞ

DOKTORA TEZİ

I. DANIŞMAN
Prof. Dr. Duygu KAYA

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Bülent POLAT

2023 – KARS

Bu çalışma KAÜ BAP Koordinatörlüğü (Proje No: 2021-TS-36) tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Köpeklerin ve insanların üreme özellikleri incelendiğinde, bu iki türdeki yakın ilişkinin dikkat çekici olduğu görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu yakın ilişkinin pubertal süreç için de geçerli olduğuna dair bulgular ve karşılaştırmalı araştırmalar rapor edilmektedir. Bu nedenle, köpeklerde üreme sürecinin daha iyi anlaşılması insanlardaki üreme araştırmaları için öncü bilgiler sağlayabilme potansiyeline sahiptir.

GnRH agonisti Deslorelin implant, köpeklerde östrusların geri dönüşümlü olarak kontrolünde geleceğe yönelik önemli bir alternatiftir. Özellikle sahipli köpeklerin reproduktif fonksiyonlarının tamamen ortadan kaldırılmadan belirli sürelerle geri dönüşümlü olarak baskılanması veya cerrahi operasyonun yan etkilerinden kaçınmak için medikal kontrasepsiyon yöntemleri tercih edilmektedir. Dişi köpeklerde uzun etkili GnRH agonistlerinin pubertanın ertelenmesi amacıyla kullanımı, etki süresi ve Deslorelin ile ilişkili östrus indüksiyonu (flare-up) güncel bir araştırma konusudur. Bu alanda yapılan çalışmaların önemli bir kısmı yetişkin köpek popülasyonlarında gerçekleştirilmiş olup pre-pubertal köpeklerdeki klinik etkilerinin yanı sıra ovaryum/uterus fonksiyonları üzerine moleküler etkilerini araştıran az sayıda bilimsel çalışma mevcuttur.

Kisspeptinin, infertilite ve üreme endokrin bozukluğu tedavilerinin mevcut dayanağı olan GnRH ve GnRH analoglarının yerini alması veya bunlarla birlikte kullanılması konusunda araştırılmaya açık pek çok alan vardır. GnRH agonistlerinin ovaryum ve uterus üzerindeki moleküler etkilerinin belirlenmesi ile köpeklerde östrusların yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik alternatif medikal kontrasepsiyon uygulamalarında kullanılabilecek analogların geliştirilmesi, aynı zamanda, gonadal fonksiyonun manipüle edilmesi için yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak sağlayacaktır. Sunulan çalışma ile dişi köpeklerde geç pre-pubertal dönemde östrusların yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik önemli bir alternatif olan Deslorelinin implant uygulaması sonrası genital dokulardaki moleküler cevapların bir bölümünün araştırılması ve pubertanın GnRH agonisti uygulamaları ile engellenmesi/ertelenmesi konularında klinik uygulamalarda potansiyel alternatiflerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, akademik hayatımın başlangıcından itibaren yol göstererek, katkı ve desteklerini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Duygu KAYA'ya, tez çalışmam süresince engin bilimsel tecrübelerinden yararlandığım, bizlere her koşulda destek olan ve yol gösteren çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Selim ASLAN'a ve tez çalışmamın başta moleküler aşamaları olmak üzere her aşamasında değerli bilgi ve görüşlerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Aykut GRAM'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Görüşleri ile tez çalışmama desteklerini esirgemeyen doktora ortak danışmanım Prof. Dr. Bülent POLAT'a ve tez izleme ve değerlendirme komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Cihan KAÇAR'a ve Prof. Dr. Turgay DEPREM'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin her aşamasında akademik desteklerinden dolayı Kafkas ve Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez çalışmamın materyal-metot bölümüne katkı sunan değerli hocam Prof. Dr. Mahmut SÖNMEZ'e saygı ve şükranlarımı sunarım. Klinik uygulamalar sırasındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Murat Can DEMİR'e ve laboratuvar çalışmalarımnda yardım ve desteklerini esirgemeyen Ünal SEVİÇ'e teşekkürü borç bilirim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen, eğitimimin her aşamasında yanımda olan ve bu günlere gelmemde emeklerini asla ödeyemeyeceğim babam Kemalettin KARADAĞ'a ve annem Aynur KARADAĞ'a minnettarım. Her zaman yanımda olarak destekleri esirgemeyen kardeşlerime ve nişanlım Dr. Öğr. Üyesi Gül Esma AKDOĞAN'a en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER	I
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLolar DİZİNİ	V
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Dişi Köpeklerin Üreme Fizyolojisi	2
1.1.1. Pubertas ve Seksüel Siklus.....	2
1.1.2. Östrus Siklusunun Evreleri.....	6
1.2. Köpeklerde Uterus ve Ovaryum Dokusunun Histolojisi.....	10
1.3. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) ve GnRH Reseptörleri (GnRH-R)	12
1.3.1. Memelilerin Hipofizinde GnRH ve GnRH Reseptörünün Ekspresyonu	18
1.3.2. GnRH'nın Pubertasın Başlamasındaki Rolü ve Önemi	19
1.3.3. GnRH Analogları	23
1.3.3.1. GnRH Antagonistleri.....	24
1.3.3.2. GnRH Agonistleri	26
1.3.4. Köpeklerde GnRH Agonistlerinin Kullanımı	28
1.4. Deslorelin Asetat	31
1.4.1. Deslorelinin Kimyasal Yapısı ve Formülasyonu	32
1.4.2. Deslorelinin Etki Mekanizması	33
1.4.3. Deslorelinin Prepubertal Dönemdeki Köpeklerde Kullanımı	34
1.4.4. Deslorelinin Köpeklerde Östrusun Baskılanması veya Ertelenmesinde Kullanımı	36
1.4.5. Deslorelinin Yan Etkileri	38
1.5. Kisspeptin.....	40
1.5.1. Hipotalamik Kisspeptin ve Kisspeptin Reseptörleri	42
1.5.2. Gonadotropin Sekresyonunun Kontrol Mekanizmasında Kisspeptinin Rolü	45
1.5.3. Kisspeptinin GnRH'nın Düzenleyicisi Olarak Pubertasın Başlamasındaki Rolü ve Önemi	46
1.5.4. Kisspeptin'in Ovaryumdaki Rolü ve Hücresel Etkisi.....	50
1.5.5. Kisspeptinin İmplantasyon-Gebelik Sürecindeki Rolü ve Hücresel Etkisi.....	55
2. MATERYAL ve METOT	58
2.1. Materyal	58
2.1.1. Hayvan Materyali	58
2.2. Metot	58
2.2.1. Çalışma Grupları	58

2.2.1.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Hormon Analizleri	59
2.2.1.2. Ovaryohistektomi Operasyonlarının Yapılması ve Dokuların Alınması	59
2.2.1.3. Alınan Dokuların İşlenmesi	60
2.2.2. Real Time qPCR için Dokuların Hazırlanması	60
2.2.2.1. Total RNA İzolasyonu	61
2.2.2.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	63
2.2.2.3. Reverse Transkripsiyon ile cDNA Sentezi.....	64
2.2.2.4. Real Time qPCR hazırlık işlemleri ve mRNA Gen Ekspresyon Analizleri.....	65
2.2.2.5. Analiz Sonuçlarının Hesaplanmasında Kullanılan Parametreler	70
2.2.3. İmmünohistokimyasal Analiz [Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmunoperoksidaz Tekniği]	71
2.2.3.1. İmmünohistokimyasal (IHC) Analizlerin Yapılması	72
2.2.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	74
3. BULGULAR	76
3.1 Serum Östradiol ve Progesteron Değerleri.....	76
3.2 Dokuların RNA Konsantrasyonu	77
3.3. Uterus Dokusunda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Ekspresyon Düzeylerinin Real Time PCR ile Yarı Kantitatif Değerlendirilmesi.....	78
3.4. Ovaryum Dokusunda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Ekspresyon Düzeylerinin Real Time PCR ile Yarı Kantitatif Değerlendirilmesi.....	80
3.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	86
3.6. Uterus Dokusunda GnRH1 ve GnRH-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu.....	86
3.7. Uterus Dokusunda KISS1 ve KISS1-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu	94
3.8. Ovaryum Dokusunda GnRH1 ve GnRH-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu ..	102
3.9. Ovaryum Dokusunda KISS1 ve KISS1-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu....	110
4. TARTIŞMA	118
4.1. Steroit Hormon Konsantrasyonları.....	119
4.2. Uterus ve Ovaryumda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Ekspresyonu	120
4.3. Uterus ve Ovaryumda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Lokalizasyonu	127
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	132
6. KAYNAKÇA	134

KISALTMALAR ve SİMGELER

A-KOR	Kappa-opioid receptor
AMH	Anti-Müllerian hormonu
AR	Androjen reseptörü
ARC	Arkuat çekirdek
ATP	Adenozin trifosfat
AVPÇ	Anteroventral periventriküler çekirdek
BDNF	Brain-derived neurotrophic faktör
Ca ₂	Kalsiyum
CAS	Chemical Abstracts Service
CL	Korpus luteum
E2	Östradiol
EOP	Endojen opioid peptitler
ERKs	Ekstraselüler signal düzenleyici kinazlar
ER α	Östrojen reseptörü α
FSH	Folikül uyarıcı hormon
FSHR	Folikül uyarıcı hormon reseptörü
GABA	Gama-aminobütirik asit
GAP	GnRH ve GnRH ile ilişkili protein
Glu	Glutamat
GnIH	Gonadotropin-inhibitör hormon
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GnRHR	Gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörü
GPCR	G proteini bağlı reseptör
GPR54/R	GPR54 reseptörü
HPG	Hypothalamic-pituitary gonadal
HSD3B	3 β -hidroksisteroid-dehidrojenaz
IM	İntra müsküler

KISSR	Kisspeptin reseptörü
KNDy	Kisspeptin, Nörokinin B ve Dynorphin nöronları
LH	Luteinize edici hormonun
LHRH	Luteinize edici hormon salgılatıcı hormon
LiSS	Ligand ile indüklenen seçici sinyalleşme
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
mg/PO	Miligram / per oral
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
ng/ml	Nanogram / mililitre
NKB	Nörokinin B
NTRK2	Nörotrofik reseptör tirozin kinaz 2
P4	Progesteron
pg / ml	Pikogram / mililitre
PGF _{2α}	Porostaglandin F ₂ alfa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
pmol	Piko mol
PR	Progesteron reseptörü
RFRP	RF ile ilgili peptitler
RP3V	Kemirgenlerin üçüncü ventrikülünün rostral periventriküler alanı
SRE	Serum response element
ZP	Zona pelusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Köpeklerde seksüel siklusun hormonal mekanizması	6
Şekil 2: Köpeklerde östrüs siklusunda meydana gelen sitolojik ve hormonal değişimler	9
Şekil 3: Köpek uterusunun histolojik yapısı	11
Şekil 4: Karnivorlarda ovaryumun histolojik görüntüsü.....	12
Şekil 5: GnRH'nın üretimi.....	14
Şekil 6: Hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenini	16
Şekil 7: Pubertası kontrol eden nöroendokrin devreler	21
Şekil 8: Deslorelinin amino asit dizilimi.....	32
Şekil 9: Kisspeptinlerin öncüsü olan prepro-kisspeptinin şematik gösterimi	41
Şekil 10: Arkuat kisspeptin/nörokinin B/dynorphin A (KNDy) nöronlarının senkronize deşarjı ve ardından GnRH salgılanması için bir modelin şematik gösterimi.....	47
Şekil 11: Pubertal gelişimde KISS1 sistemindeki değişiklikler.....	49
Şekil 12: Ovaryumlardaki foliküllerde ve korpus luteumda kisspeptinin (KISS1) varsayılan otokrin ve parakrin etkilerinin şematik gösterimi.....	51
Şekil 13: Kisspeptinin ovaryumdaki işlevi	52
Şekil 14: Kisspeptin/KISS1R sisteminin ovaryumdaki rolü	53
Şekil 15: Deslorelin implantın interskapular bölgeye uygulanması.....	59
Şekil 16: Dokuların anatomik yapısına göre bölümlendirilmesi.....	60
Şekil 17: Dokuların total RNA izolasyonu için hazırlanması	61
Şekil 18: Dokulara Trizol eklenmesi, homojenizatörden geçirilmesi ve kloroform eklenen dokuların santrifüj edilmesi	62
Şekil 19: Doku fazları ve RNA peletinin çıkarılması.	62
Şekil 20: Spektrofotometrik ölçümler ile RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi.	64
Şekil 21: Reverse transkripsiyon ile cDNA sentezi aşamaları.	65
Şekil 22: Hedef ve housekeeping gen primerleri.	66
Şekil 23: Amplifikasyon eğrisinin oluşumu.....	68
Şekil 24: Bio-RAD (CFX [®] 96 Real Time system) PCR cihazı ve gen ekspresyon işlemleri	69
Şekil 25: Parafin blokların hazırlanması	71
Şekil 26: Parafin bloklardan kesitleri alınan dokuların İmmünohistokimyasal analizler için hazırlanması.	72
Şekil 27: İmmünohistokimyasal analizlerin aşamaları.	72
Şekil 28: İmmünohistokimyasal analizlerde kullanılan antikorlar.....	73
Şekil 29: Dokuların ışık mikroskopunda değerlendirilmesi.....	74
Şekil 30: Grupların ortalama serum östradiol (E2) ve progesteron (P4) konsantrasyonu.	76
Şekil 31: Grupların uterus ve ovaryum dokularından elde edilen RNA konsantrasyonları	77
Şekil 32: Uterus dokusunda GnRH1 ve GnRH-R'ün ekspresyonu.....	79
Şekil 33: Uterus dokusunda KISS1 ve KISS-R ekspresyonu.	79

Şekil 34: Ovaryum dokusunda GnRH1 ve GnRH-R'ün ekspresyonu	81
Şekil 35: Ovaryum dokusunda KISS1 ve KISS-R ekspresyonu.	81
Şekil 36: Östrus grup GnRH1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	87
Şekil 37: Non-Östrus grup GnRH1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	88
Şekil 38: Kontrol grup GnRH1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	89
Şekil 39: Östrus grup GnRH-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	91
Şekil 40: Non-Östrus grup GnRH-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	92
Şekil 41: Kontrol grup GnRH-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu.....	93
Şekil 42: Östrus grup KISS1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	95
Şekil 43: Non-Östrus grup KISS1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	96
Şekil 44: Kontrol grup KISS1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	97
Şekil 45: Östrus grup KISS1-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	99
Şekil 46: Non-Östrus grup KISS1-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	100
Şekil 47: Kontrol grup KISS1-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	101
Şekil 48: Östrus grup GnRH1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu.	103
Şekil 49: Non-Östrus grup GnRH1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	104
Şekil 50: Kontrol grup GnRH1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	105
Şekil 51: Östrus grup GnRH-R'ünün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	107
Şekil 52: Non-Östrus grup GnRH-R'ünün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	108
Şekil 53: Kontrol grup GnRH-R'ünün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	109
Şekil 54: Östrus grup KISS1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	111
Şekil 55: Non-Östrus grup KISS1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu.....	112
Şekil 56: Kontrol grup KISS1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu.....	113
Şekil 57: Östrus grup KISS1-R'ünün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	115
Şekil 58: Non-Östrus grup KISS1-R'ünün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	116
Şekil 59: Kontrol grup KISS1-R'ünün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu	117

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Köpeklerde GnRH agonistlerinin avantaj ve dezavantajları	30
Tablo 2: Çalışma grupları ve yapılan uygulamalar.	59
Tablo 3: Reverse Transkripsiyon ile cDNA bileşenlerinde komponent hacimleri.	65
Tablo 4: Kullanılan genlerin oligonükleotit dizileri ve genbank referans numaraları.	67
Tablo 5: SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit mRNA gen ekspresyon bileşenleri.	68
Tablo 6: RT-qPCR analizleri yapılan genlerin amplifikasyon koşulları	69
Tablo 7: Gen ekspresyon metodu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ Livak Metot).	70
Tablo 8: Grupların ortalama serum östradiol (E2) ve progesteron (P4) konsantrasyonlarının karşılaştırılması	76
Tablo 9: Grupların uterus ve ovaryum dokularının RNA konsantrasyonları.....	77
Tablo 10: Uterus dokusunda hedef genlerin gruplara göre ortalama FC değerleri.....	78
Tablo 11: Ovaryum dokusunda hedef genlerin gruplara göre ortalama FC değerleri	80
Tablo 12: Östrus Grubunun Fold Change ve logaritmik transformasyon değişim katsayıları.	83
Tablo 13: Non-Östrus Grubunun Fold Change ve logaritmik transformasyon değişim katsayıları.	84
Tablo 14: Kontrol Grubunun Fold Change ve logaritmik transformasyon değişim katsayıları.	85
Tablo 15: Uterus dokusunda GnRH1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.	86
Tablo 16: Uterus dokusunda GnRH-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.	90
Tablo 17: Uterus dokusunda KISS1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.....	94
Tablo 18: Uterus dokusunda KISS1-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.	98
Tablo 19: Ovaryum dokusunda GnRH1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.	102
Tablo 20: Ovaryum dokusunda GnRH-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.....	106
Tablo 21: Ovaryum dokusunda KISS1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.	110
Tablo 22: Ovaryum dokusunda KISS1-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.	114

**Geç Prepubertal Dönemdeki Dişi Köpeklerde Deslorelin İmplant
Uygulamalarını Takiben Ovaryum ve Uterusta GnRH ve Kisspeptin Reseptör
Ekspresyonu**

ÖZET

Günümüze kadar yapılan sınırlı sayıda araştırma sonuçları, pubertanın uzun süreli baskılanmasında kullanılan GnRH analogu Deslorelinin, köpeklerde sonraki üreme aktivitesi ve ovaryumun işlevselliği üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak pubertanın GnRH agonistleri ile uyarılması ve olası yan etkileri üzerine araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Bu çalışma ile dişi köpeklerde östrusların yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik önemli bir alternatif olan Deslorelinin implantın geç pre-pubertal dönemde uygulaması sonrası genital dokulardaki GnRH/R ve KISS1/R ekspresyonu ve lokalizasyonları incelenmiş, GnRH agonisti uygulamaları ile pubertanın engellenmesi/ertelenmesi konularında ileri araştırmalar için tür düzeyinde katkı sunulması amaçlanmıştır.

Bu amaçla sahipleri tarafından kliniklerimize ovaryohisterektomi (OHE) talebi ile getirilen ve pre-pubertal dönemde olduğu anamnez ve klinik/laboratuvar bulgularıyla teyit edilen farklı ırklardan ortalama $7,79 \pm 0,17$ aylık yaşta toplam 25 adet dişi köpeğe ait ovaryum ve uterus dokuları kullanıldı. Deslorelin asetat (Suprelorin®, 4,7 mg, Virbac, Fransa) içeren implant interskapular bölgeye subkutan olarak uygulandı. Uygulama sonrası klinik östrüs gösteren 6 köpek östrus grubunu (EST), klinik östrüs gözlenmeyen 10 köpek Non-östrus grubunu (N-EST) oluşturdu. Plasebo implant uygulanan 9 köpek kontrol (KONT) grubu olarak kullanıldı. İmplant uygulaması sonrası ortalama 35. günde tüm köpeklerin OHE operasyonları gerçekleştirilerek rutin doku işleme prosedürü uygulandı. PCR analizleri için standart protokoller kullanılarak elde edilen RNA örnekleri cDNA sentezi çalışmalarında kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı. Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri SYBR Green Bazlı Real Time qPCR yöntemi ile belirlendi. İmmünohistokimyasal analizler, Strep-ABC (Streptavidin Biotin Kompleks) immünooperoksidaz yöntemi uygulanarak yapıldı.

GnRH1 ekspresyonunun, kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla implant yerleştirilen ÖST ve N-ÖST gruplarındaki uterus dokularında azaldığı, bu azalmanın N-ÖST grubunda diğer gruplara göre anlamlı olduğu belirlendi ($p = 0,02$). GnRH-R, KISS1/R'ünün uterus dokusundaki ekspresyonu bakımından gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı ($p > 0,05$). Ovaryum dokularında KISS1 ve KISS1-R ekspresyon seviyeleri deslorelin implant uygulanmasından etkilendi ($p < 0,05$). Her iki faktörün ekspresyonu ÖST grubuna kıyasla N-ÖST ve KONT grubundaki hayvanlarda daha yüksekti. Doku kesitlerinde GnRH1/R'nin immünreaktivitesi uterus ve ovaryum dokusunun tüm katmanlarında tüm gruplarda farklı oranda pozitif, ancak KISS1 hem uterus hem de ovaryum dokularında tüm gruplarda GnRH/R'üne kıyasla daha zayıf immünreaktivite gösterdi.

Sonuç olarak bu çalışmada Deslorelin asetat uygulanan prepubertal dişi köpeklerde ovaryum ve uterus dokularında farklı düzeylerde olmakla birlikte, KISS1–KISS1R ve GnRH-GnRH-R ekspresyonu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara dayanılarak GnRH agonisti deslorelinin köpeklerde hipofiz seviyesinde olduğu kadar ovaryum düzeyinde de doğrudan etki gösterebileceği ve ovaryum GnRH ve KISS reseptörleri aracılığıyla steroidogenezisi doğrudan etkileyebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte gelecekte ovaryum fizyolojisi ve işlevselliğinde önemli rol oynayan farklı faktörleri içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Deslorelin, Pre-pubertal dişi köpek, GnRH/GnRH-R, KISS1/KISS-R

Expression of GnRH and Kisspeptin Receptors in the Ovary and Uterus in Deslorelin Treated Late-Prepubertal Bitches

SUMMARY

The limited number of research results to date indicate that; the GnRH analogue Deslorelin, which is used in the long-term suppression of puberty, has no adverse effects on subsequent reproductive activity and ovarian functionality in dogs. However, studies on the stimulation of puberty and possible side effects with GnRH agonists are still insufficient. In this study, the expression and localization of GnRH/R and KISS1/R in the genital tissues after the application of Deslorelin, which is an important future alternative in the management and control of estrus in female dogs, in the late pre-pubertal period were investigated.

For this purpose, ovarian and uterine tissues of 25 female dogs with an average age of 7.79 ± 0.17 months from different breeds, who were brought to our clinics by their owners with a request for ovariohysterectomy (OHE) and confirmed by anamnesis and clinical/laboratory findings in pre-pubertal period, were used. The implant containing Deslorelin acetate (Suprelorin®, 4.7 mg, Virbac, France) was applied subcutaneously to the interscapular region. After the application, 6 dogs were grouped as estrus (EST) and 10 dogs as Non-estrus (N-EST). Nine dogs with placebo implants were served as the control (CONT) group. OHE operations were performed for all dogs on an average of 32-40 days after implantation and routine tissue processing procedure was performed. The RNA samples obtained using standard protocols for PCR analyzes were stored at -80°C until used in cDNA synthesis. Expression levels of target genes were determined by SYBR Green Based Real Time qPCR method. Immunohistochemical analyzes were performed using the Strep-ABC (Streptavidin Biotin Complex) immunoperoxidase method.

It was determined that the expression of GnRH1 was decreased in the uterine tissues of the implanted OST and N-OST groups compared to the animals in the control group, and this decrease was significant in the N-OST group compared to the other groups ($p = 0.02$). There was no statistical difference between the groups in terms of the expression of GnRH-R, KISS1/R in uterine tissue ($p > 0.05$). Expression levels of

KISS1 and KISS1-R in ovarian tissues were affected by Deslorelin treatment ($p < 0.05$). Expression of both factors was higher in animals in the N-OST and KONT groups compared to the OST group. In tissue sections, immunoreactivity of GnRH1/R in all layers of uterus and ovarian tissue was different in all groups. However, KISS1 showed weaker immunoreactivity in both uterus and ovarian tissues compared to GnRH/R in all groups.

In conclusion, KISS1–KISS1R and GnRH–GnRH-R expressions were determined, although at different levels, in the ovarian and uterus tissues of prepubertal female dogs treated with Deslorelin acetate. Based on the findings, it is thought that the GnRH agonist deslorelin may act directly at the ovarian level as well as at the pituitary level in dogs, and may directly affect steroidogenesis through ovarian GnRH and KISS receptors. However, there is a need for future studies involving different factors that play an important role in ovarian physiology and functionality.

Keywords: Deslorelin, Prepubertal bitches, GnRH/GnRH-R, KISS1/KISS-R

1. GİRİŞ

Hipofiz, büyüme, stres, gelişme, iştah ve üreme gibi farklı fizyolojik süreçlerden sorumlu olan endokrin hormonları sentezleyen farklı hücre gruplarını içermektedir (Sower 2018). Bunların arasında gonadotropinler; gonadal büyüme, farklılaşma ve steroid üretimi dahil olmak üzere gonadal fonksiyonların başlıca endokrin düzenleyicileridir (Kumar 2005).

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), pubertasin başlaması ile birlikte üreme fonksiyonunun devamlılığının sağlanmasında yüksek oranda gerekli olan bir nöroendokrin dekaeptittir (Whitlock ve ark. 2019). GnRH ve kisspeptin içeren iki ana hipotalamik nöroendokrin hücre grubu, memelilerde hipotalamus-hipofiz-gonadal (HPG) ekseninin kontrolü için çok önemli rol oynamaktadırlar (Ogawa ve Parhar 2022). Hipofizin ön lobundaki gonadotrop hücreleri, hipotalamik GnRH sinyali ile eşey hücre rezervuarları ve gonatların steroit hormon üretkenliği arasındaki sistemin düzenleyicisi olarak kritik bir rol oynar. Bu nedenle Gonadotropun hipotalamik GnRH'ye yanıtının altında yatan mekanizmalar reproduktif fonksiyonu ve fertilitenin moleküler temelini anlamamız için büyük önem taşımaktadır (Bliss ve ark. 2010). Kisspeptin, pulsatil GNRH sekresyonunun düzenlenmesinden ve pubertasin başlamasından sorumlu faktörlerden biridir. Bazal ön beyindeki GnRH nöronları, HPG ekseninin başlıca uyarıcı güçleri olarak bilinirler. Hipotalamik GnRH'nın ortanca eminesteki akson terminallerinden hipofizyal dolaşıma pulsatil salınımı ile lüteinize hormon (LH) ve folükül uyarıcı hormonun (FSH) pulsatil sekresyonunu başlatmak için ön hipofizdeki gonadotroplar üzerinde etki göstermektedir (Herbison ve ark. 2008, Constantin 2011).

Köpeklerin seksüel siklusları birçok yönüyle diğer türlerden farklıdır. Mevsime bağlı olmayan monoöstrik hayvanlar olan köpekler, spontan ovulasyon gösterirler, lüteal evrenin uzun olması ve uzun bir anöstrus dönemine sahip olmaları onları diğer evcil hayvan türlerinden ayıran önemli özelliklerindendir (Concannon 2011).

Doğal GnRH'dan 7 kat daha güçlü sentetik bir GnRH agonisti olan Deslorelin, hipotalamustan fizyolojik pulsatil GnRH salınımını taklit etmesi için uygulanır. Sürekli veya uzun süre etkili GnRH agonistlerinin kullanılması, GnRH reseptörlerinde

duyarsızlaşmaya neden olur ve bu da reseptörlerin down-regülasyonuna ve azalmasına yol açar (Gobello 2007, Fontaine ve Fontbonne 2011).

Deslorelin implantlar, köpeklerde östrusların yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik önemli bir alternatiftir. Üçüncü nesil, yavaş salınan uzun etkili bir GnRH agonisti olan Deslorelin implantı, 15 yıldan fazla erkek ve dişi köpeklerde rutin klinik uygulamalarda ve araştırmalarda kullanılarak dişi köpeklerde pubertanın ertelenmesinde ve östrus yönetiminde oldukça başarılı olduğu görülmektedir (Kaya ve Ay 2017).

Dişi köpeklerde uzun etkili GnRH agonistlerinin pubertanın ertelenmesi amacıyla kullanımı, etki süresi ve flare-up güncel bir araştırma konusudur ve klinik ve histopatolojik/moleküler yönden ovaryum/uterus fonksiyonları üzerine etkilerini araştıran az sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. Köpeklerde, şimdiye kadar üreme dokularında sadece bir GnRH izoformu (GnRH-I) ve bir reseptör tipi tanımlanmıştır ve köpek uterus ve plasentadaki alanlarındaki ekspresyonları son zamanlarda yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır (Schäfer-Somi ve ark. 2015).

1.1. Dişi Köpeklerin Üreme Fizyolojisi

1.1.1. Pubertas ve Seksüel Siklus

Bir hayvanın olgunlaşarak üreme yeteneğine sahip bir yetiştikine dönüştüğü fiziksel değişim süreci olan “pubertas” karmaşık şekilde birbirine bağlı faktörleri içeren memeli üreme fizyolojisinin gizemli bir yönüdür. Evcil köpeklerin prepubertal ve pubertal dönemleri hakkında henüz açıklanmamış birçok fizyolojik süreç olmasına rağmen çok az çalışma mevcuttur. Daha fazla bilgi elde edilinceye kadar, tanımların daha iyi standardizasyonu, deneysel değişkenlerin ve tamamlanma noktalarının dikkatli ve eksiksiz bir tanımı, köpeklerdeki pubertal süreci tarafsız olarak değerlendirmek açısından önem arz etmektedir (Gobello 2014). Pubertanın akut bir geçiş dönemi değil bir süreç olduğu ve fiziksel/hormonal ve davranışsal değişim sürecinin yanı sıra birbiriyle bağlantılı çok sayıda faktörü içerdiği unutulmamalıdır. Geç bebeklik döneminde başlayan pulsatif GnRH salgısı juvenil gelişim aşamasına kadar devam etmektedir, nörobiyolojik olarak kısıtlandığı prepubertal süreçte pulsatif GnRH uyarımlarına ek olarak beslenme, mevsim, stres ve diğer psikososyal

faktörlerinde pubertasın zamanını ve hızını derinden değiştirebileceği kabul edilmektedir (Plant 2015). Pubertanın başlangıcı dişilerde ilk proöstrüsün gözlenmesi ve erkeklerde ilk ejakülatta ilk spermatozoanın görülmesi ile karakterizedir. Ancak köpeklerde pubertal sürecin başlangıcında dişilerde sakin kızgınlık, bölünmüş östrus ve erkeklerde aspermi, oligospermi gibi fonksiyonel anormallikler gözlenebilir. Bu sebeple puberta ve pubertanın bir sonraki adım olan cinsel olgunluğa geçişteki gelişimsel süreç, birbiriyle ilişkili olağanüstü karmaşık bir dizi içsel ve dışsal olaylara dayanır (Kaya 2022).

Pubertal dönemin başlama yaşı köpeklerde genellikle 8 ila 12 ay (4-22 ay) arasında olduğu kabul edilir. Ancak unutulmamalı ki hepsi aynı tür olmasına rağmen biyolojik süreçler (büyüme ve üreme dahil) farklı vücut ölçülerinde farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bu nedenle “kronolojik yaşı gerçekten belirleyici olup olmadığı” köpeklerde prepubertal dönemde yapılan reproduksiyon araştırmalarında en önemli sorulan sorudur. Çalışma tek bir cinsin homojen bir popülasyonunu içermedikçe, cevap “hayır” olarak kabul edilir. Yani büyük ve dev ırklar ile 5-6 aylık yaşta pubertaya ulaşan küçük ve minyatür köpek ırklarda yapılacak reproduktif girişimlerden alınacak yanıt farklıdır çünkü büyük ve dev ırk köpekler o yaşta hala 'büyük boy yavrulardır' ve ancak 18 ay sonra pubertaya ulaşırlar. Köpeklerde pubertal geçiş sürecinin yaş dışında cinsiyet, genetik özellikler, fiziksel gelişim/vücut ağırlığı, vücut kondisyon skoru, sosyal faktörlerden etkilendiğini bilmek ve hayvanın reproduktif durumunu doğru değerlendirmek gerekir (Kaya 2022).

Yapılan bu değerlendirme uygulamaların sonuçlarını öngörmek ve seçenekleri hayvan sahibine doğru şekilde anlatmak için önem arz etmektedir. Pubertanın başlamasında yukarıda özetlenen faktörlerin etkisi ile hem dişilerde hem de erkeklerde gonadların ve beynin ilgili bölümlerinin olgunlaşması gerekmektedir. Bu seksüel olgunlaşma süreci hipotalamustan GnRH artışı, ön hipofizde FSH ve LH artışı ve periferik gonadotropin reseptörü ekspresyonundaki artış ile paralel gelişir. Ele alınan tüm bu faktörler köpeklerde prepubertal dönemde yapılabilecek reproduktif girişimleri sınırlamaktadır. Pubertal dönemde yapılan uygulamalar ile pubertanın uyarılmasından ziyade tamamen engellenmesini (medikal/cerrahi yöntemler) veya uzun süre baskılanmasını (medikal yöntemler) içerir. Seçilecek olan yöntemin güvenli, etkili ve

bazen geri dönüşümlü (hayvan sahibinin talebi doğrultusunda) olmalıdır ve normal vücut gelişiminin engellenmemesinde dikkate alınan önemli bir avantaj olacaktır (Kaya 2022).

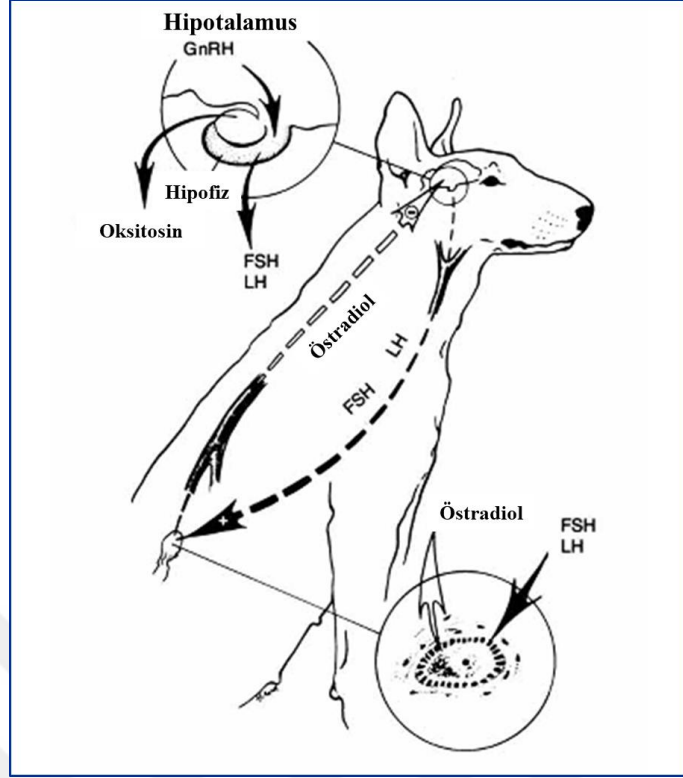
Mevsime bağlı olmayan monoöstrik hayvanlar olan köpeklerin seksüel siklusları birçok yönleri bakımından diğer türlerden farklıdır. Spontan ovulasyon gösteren bu türü diğer evcil hayvan türlerinden ayıran önemli özellikleri; lüteal evrenin uzun olması ve uzun bir anöstrus dönemine sahip olmalarıdır (Concannon 2011).

Köpeklerde östrus siklusu; proöstrus, östrus, metöstrus-diöstrus ve anöstrus olmak üzere dört dönemden oluşur. Proöstrus kanamasının görülmesi östrus siklusunun başlangıcı olarak kabul edilir. Köpeklerde, her siklus, değişken sürelerdeki bir anöstrus dönemi ile sonlanır. İki ardışık proöstrus arasındaki süre genellikle inter östrus aralığı olarak adlandırılır. Yıldaki siklus sayısı ve inter östrus aralığı ırklar arasında büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Östrus siklusunun belirtileri ve düzenliliği ırklar ve hatta genetik kuşaklar arasında değişebilse de her köpek için düzenlidir. Bu nedenle, östrusun indüksiyonu veya baskılanmasında kontraseptif bir medikal protokol tasarlarken belirli bir köpek içinde östrus siklusunun düzenliliği hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir, çünkü medikal tedavi programının ayarlanmasında östrus siklusunun her evresindeki fizyolojik bilgilere ihtiyaç duyulacaktır (Payan-Carreira ve ark. 2016).

Köpeklerde seksüel siklusun hormonal değişiklikleri hipotalamus, hipofiz ve ovaryumlar tarafından salınan hormonlar ile kontrol edilir. Hipotalamustan salınan GnRH hipofiz gonadotropinleri olan FSH ve LH salınımını uyarır. Ovaryum steroidleri olan östrojen ve progesteron, tubuler kanalı siklik değişiklere hazırlayarak, meme bezlerini ve seksüel davranışları kontrol ederken, FSH ve LH ovaryum fonksiyonlarını düzenler (Alaçam 2015). Köpeklerde seksüel siklusun hormonal mekanizmaları, hormon profillerinden ve deneysel manipülasyonların sonuçlarındanda elde edilen bilgiler diğer memeli türlerinden farklı değildir. LH, FSH ve prolaktin hormonal değerler birçok memeli türlerindeki gibi antiserumlara dayalı heterolog testler veya homolog testler kullanılarak tespit edilir (Concannon 2011).

Foliküler gelişimin gerçekleşmesi ile östrojen konsantrasyonları önemli seviyelere ulaşmaya başlar ve foliküller ovulasyon öncesi boyuta ulaştıkça pik yapar. LH, proöstrus boyunca epizodik olarak üretilir. Başlangıçta LH dalgalanmaları küçüktür ve günde birkaç kez meydana gelir. LH'deki bu küçük dalgalanmalar, ovaryumlardaki küçük foliküllerin luteinizasyonu ile sonuçlanır ve bu da progesteronda yavaş ama sabit bir artışa neden olur. Proöstrusun sonuna doğru, LH'de bir ovulasyon öncesi büyük bir dalgalanma meydana gelir, bu da ovaryumlar üzerindeki herhangi bir olgun folikülün ovulasyonuna ve progesteron konsantrasyonlarında ani bir artışa neden olur (Lopate 2008). Köpeklerde diğer memeli türlerinden farklı olarak, kan progesteron seviyesi hızla artarken, östrojen hormon seviyesinin düştüğü görülür ve östrüs belirtileri farklı olarak progesteron etkisi altında artar. LH salgısını takiben 48 saat içinde ovulasyon şekillenir ve LH seviyesi ovulasyon sonrası hızla bazal seviyelere düşer. Ovulasyon sonrası yine LH etkisiyle korpus luteum şekillenerek progesteron salgısı devam eder. Gebelik şekillenmiş ya da siklus boş geçmiş olsa da, korpus luteum ovulasyondan sonra 50-70 güne kadar progesteron salgılamaya devam eder (Alaçam 2015).

Ovulasyon proöstrüsün sonuna doğru, LH hormonundaki 1-3 günlük bir yükselme ve FSH 'da 1-4 günlük bir yükselme ile sonuçlanan gonadotropin dalgalanmasına yanıt olarak meydana gelir. Dişi köpeklerde, diğer memelilerin çoğunun aksine, oositin olgunlaşması, ovulasyondan 2 gün sonra tubuler distal uterusda meydana gelir. Aynı şekilde, birçok kemirgen ve memelide olduğu gibi köpeklerde de lüteotropin için LH'ya ek olarak prolaktine ihtiyaç vardır (Olson ve ark. 1984). Ovulasyon sonrasındaki 20 ila 30. günden itibaren 30-40 günde siklusa yavaş gerileme, periyodik hücre ölümü, hücre boyutunda küçülme, düşük apoptoz seviyeleri ve endojen prostaglandin-F'nin üretiminin minimal veya orta düzeyde katılımı ile lütellolizis başlar (Concannon 2009). Köpeklerde seksüel siklusun hormonal mekanizması aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Köpeklerde seksüel siklusun hormonal mekanizması: GnRH, hipofizi FSH ve LH üretmesi için uyarır. FSH ve LH, östrus siklusu sırasında birkaç önemli işlevi olan östradiölü üretmek için ovaryumlardan folikülleri uyarır. FSH ve LH dengesi siklus sırasında değişir ovulasyonun oluşması ve gebeliğin devamlılığı için progesteron üretimini sağlar (Holst 2019).

1.1.2. Östrus Siklusunun Evreleri

Köpeklerde pubertas yaşı çoğunlukla vücut büyüklüğünden etkilenir, ancak beslenme çevresel etkileşiminde pubertası etkilemektedir. Dişi köpeklerde pubertas, hayvannın olgun vücut ağırlığının %70-80'ine ulaştığında meydana gelir (Gobello 2014). Köpeklerin östrus siklusunun evreleri, düzenli aralıklarla tekrar eden proöstrus, östrus, diöstrus ve anöstrüs dönemi olmak üzere dört aşama oluşturur (Concannon 2011). Köpeklerin östrüs siklusunun her aşamasının uzunluğu, gebelik olsun ya da olmasın oldukça sabit olan diöstrüs dönemi dışında, bireysel olarak değişir (Payan-Carreira ve ark. 2016).

Proöstrus Dönemi: Artan östrojen hormonun etkisiyle ilk önce genellikle serosanginöz vulva akıntısı, vulvada ödem ve proöstrus kanaması olarak adlandırılan kanama ile siklus başlar. Köpeklerde Proöstrus ortalama 9 gün sürmektedir. Vulva

büyümeye başlamış vajina ödemleşmiş ve vajina epitel katmanında epitel proliferasyonlar başlamıştır. Vajinal smear epitel hücre profilleri, parabazal hücreler (değişen sayıda nötrofillerin eşlik ettiği) fazla olmakla birlikte intermediyer hücreler baskın hale gelmeye (%98-100) başlamıştır. Serosanginöz akıntı sağlam ve parçalanmış eritrositler içeren seröz sıvı ve bunların uterusu diapedezden kaynaklanan hemoglobin; sayılarında veya görünümünde güvenilir bir karakteristik değişiklik yoktur. Vajinoskopik muayede, vajina mukozası, pembemsi beyazdan kademeli olarak değişen, yüzeyde serosanginöz sıvı ile ve belirgin hale gelen derin vajinal kıvrımlı ve ödemli görünür. İlk başlarda erkek köpeklere olan saldırgan yanıtlarda giderek bir düşüş görülür. Çiftleşme denemelerinin reddedilmesi, aşamalı olarak saldırgandan kararsızlığa doğru değişmeye başlar. Erkek köpeklerin ilgisini çeken feromon sekresyonu metil p-ydroksibenzoat içerir. Serum östradiol başlangıçta 5 ila 15 pg / ml (~20-55 pmol / l) seviyelerindeyken proöstrus boyunca artarak, 40-120 (ortalama 70) pg / ml (~150-450, ortalama 255) piklere ulaşır. Proöstrus, östradiol zirvesinden 0,5-3 gün sonra ortaya çıkan preovulatör LH dalgalanması ve çiftleşme davranışın başlaması ile sona ermektedir. Endokrinolojik olarak fizyolojik proöstrus preovulatör LH dalgalanması ile biter ([Lopate 2008](#), [Concannon 2009](#), [Concannon 2011](#)).

Östrus Dönemi: Köpeğin, erkek köpeği kabul etmesi ve çiftleşme davranışları göstermesi ile karakterize dönemdir. Östrüs dönemi değişken olmakla birlikte ortalama 9 gün sürer. Fizyolojik östrus başlangıcının belirgin bir sitolojik korelasyonu yoktur, ancak anatomik olarak östrojen-progesteron oranındaki keskin düşüşe yanıt olarak LH dalgalanmasından ± 1 gün sonra endoskopik olarak görüntülenen vajinal mukozanın kıvrımlaştığı (büzüştüğü) görünür. Östradiol, geç proöstrus zirvesinde 10-20 pg / ml (~40-90 pmol / l) ara değerlerine kadar düşüşünü sürdürmektedir. Preovulator LH dalgalanması sırasında serum progesteronu hızla 1-3 ng / ml'nin (3-6 nmol / l) üzerine çıkar ve 10. günde, östrüsün bitiminde veya kısa bir süre sonra hemen hızla artarak 10-25 ng / ml'ye ulaşır (~ 30-80 nmol / l) ([Concannon 2009](#), [Concannon 2011](#)).

Bu dönemde vulvanın ödemleşmesi daha az fark edilir hale gelir ve vajinal akıntı daha sulu görünür. Kızgınlık yaklaşık 9 gün sonra dişinin erkeği 2 gün üst üste

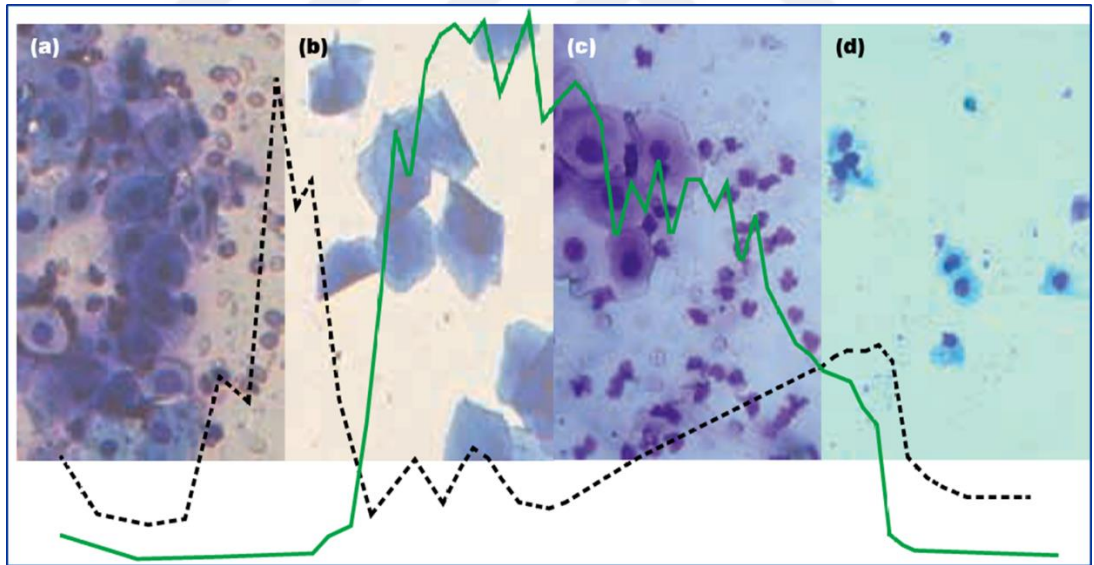
kabul etmeyi reddetmesiyle sona erer. Vajinal smearda ağırlıklı olarak çekirdeksiz kornifiye hücreler (süperfacial hücreler) ve orta derecede eritrosit görülürken, lökositler nadir görülür. Erken östrusta uterus endometrium hala ödemli görünür, ancak ovulasyondan sonra daha az ödem, artmış stromal kollajen ve artan sayıda matür, hipertrofik, sekretuar bezler (bazal ve kript bezleri) vardır. Devam eden myometrial düz kas hücre proliferasyonu ve hipertrofisi gözlenmektedir. (Rehm ve ark. 2007).

Metöstrus (Diöstrus) Dönemi: Metöstrus döneminin başlangıcı östrus davranışının sona erdiği dönem olarak tanımlanmıştır. Bu dönemde dişi köpek, erkek köpek için çekici olmasına rağmen çiftleşmeyi kabul etmemesiyle başlayan lüteal evre olarak tanımlanır. Östrus bitiminde anöstruse kadar geçen süreyi kapsayan metöstrus ortalama 65 (55-90) gün sürmektedir. Korpus lüteumun tamamen gelişmesi ovulasyon sonrası 15-25 güne kadar sürer ve büyüklüğü 4-6 mm çapına ulaşır. Vajinal sitolojide nötrofil lökosit sayısının aniden artması, intermediyer ve parabazal hücrelerin tekrar görülmesi ve süperfisiyale hücre oranında ani düşüş görülür. Ayrıca bu dönemde sitoplazmasında vakuol bulunan ve köpük hücresi olarak adlandırılan parabazal hücrelerde rastlanır (Concannon 2011, Alaçam 2015). Progesteron düzeyi 15-30. günlerde 15-90 ng/ml'ye ulaşır. Gebe olmayan köpeklerde kan progesteron düzeyi metöstrusun 55-110. günlerine kadar 1 ng/ml'nin altına düşer. Östrojen düzeyi değişken olmakla birlikte daima düşüktür. Diöstrus başlangıcında 2-15 pg/ml iken ortasında 15-30 pg/ml olduğu bildirilmektedir. Bu dönemde vajinal kıvrımlar düz ve yuvarlaktır ve vajina duvarı hiperemiktir (Concannon 2009, Kalkan ve Öcal 2013).

Bu dönemde köpeğin huzursuz davranışı durur ve vajinal akıntı ve vulva ödemi azalır. Meme bezleri büyür ve salgı aktivitesi gösterebilir. Köpeklerde ayrıca tipik olarak gebelikle ilişkili başka değişiklikler, (karın büyümesi ve yuva arama davranışı) sergileyebildiğinden, diöstrus, yalancı gebelik aşaması olarak da adlandırılır. Açık bir yalancı gebelik belirtisi yoksa bu diestrus dönemine gizli yalancı gebelik denir. Bu dönemde ovaryumlarda corpus luteum regresyonu ve küçülmesi, diöstrusun 20. günü civarında başlar ve apoptotik lüteal hücrelerin varlığı ile tespit edilir. Uterus stroması, yoğun olgun kollajen salgılar. Gerileyen uterus değişiklikleri, diestrusun 3. haftasında

başlar ve yaygın endometriyal apoptoz, bazal glandüler epitelyumun düzleşmesi ve stromal kollajen kaybı ile kendini gösterir (Rehm ve ark. 2007).

Anöstrus Dönemi: Köpeklerde anöstrus dönemi, ovaryum aktivitesinin bulunmadığı dönemi kapsar. Kan progesteron seviyesinin 1–2 ng / ml'nin altına düşmesinden sonra en az 7 hafta süren ve ortalama 18-20 hafta süren dönem olarak kabul edilir. Vajinal sitoloji az sayıda parabazal hücre görülür. Vajinal mukoza ince, kırmızı ve kılcıl damarlar görünür. Bu dönemde yüzey kolayca travmatize olur ve smearlarda travmaya bağlı eritrositler görülebilir. Serum östradiol düzeyinin değişken olduğu ancak 5-10 pg / ml'den (~15–35 pmol/l) düşük olduğu bildirilmektedir. Serum progesteron, 1 ng / ml'nin altındadır (Concannon 2009, Concannon 2011). Anöstrus döneminde ovaryumda CL (corpus luteum) gerilemeye devam eder ve medullaya doğru daha derine yerleşir. Gerileyen CL düzensiz lobülasyon gösterme eğilimindedir ve luteal hücreler büyük sitoplazmik vakuoller içerir. CL kalıntıları birkaç ay sürebilir ve bir sonraki östrus siklusundada hala fark edilebilir (Şekil 2) (Rehm ve ark. 2007).



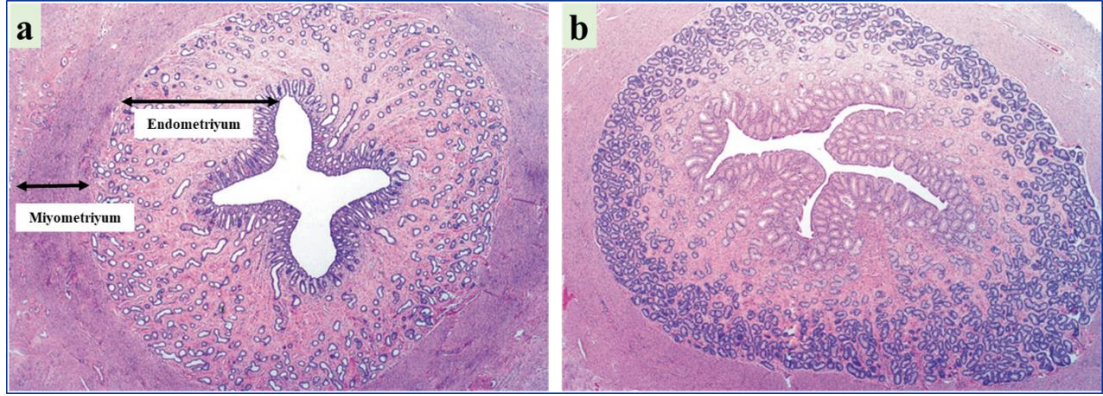
Şekil 2: Köpeklerde östrus siklusunda meydana gelen sitolojik ve hormonal değişimler (a: Pröstrus, b: Östrus, c: metöstrüs, d: Anöstrus, Östrojen: siyah kesik çizgiler ve progesteron: Yeşil devamlı çizgiler) (England ve Heimendahl 2010).

Üreme sistemi GnRH ve Kisspeptin temel rol oynamak üzere birçok reproduktif hormon aracılığı ile düzenlenir. Bu hormonların reproduksiyondaki rollerini yorumlayabilmemizde yardımcı olacak moleküler çalışmaları anlamada nöroendokrinolojiye ve nöral sistemin anatomisine hakim olmamız gerekmektedir.

Sinir sistemi ile endokrin sistemin metabolik ve hormonal homeostatik aktiviteleri arasındaki etkileşimler nöroendokrinoloji olarak tanımlanır. Sinir sisteminin sahip olduğu bir rol, çevreyi vücutla ilişkilendirmektir. Nörohipofizyal nöronlar paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerden köken alır ve hipotalamik-hipofiz sapı boyunca sinir uçlarının vazopressin ve oksitosin salgıladığı arka hipofize geçerler. Hipofizyotropik nöronlar spesifik hipotalamik çekirdeklere lokalizedirler, buradan aksonlarını median eminense yansıtırlar, burada hormonlar salgırlar, bu da peptitlerin ve biyoaminlerin proksimal hipotalamik-hipofiz damarlarına salınımını uyarır veya inhibe eder. Median eminensin kanlanması, superior hipofizyal arterden ve onun zengin kılcal kapiller yataklarından gelir, bunlar median eminense uzanır ve ardından birleşerek hipofiz sapını geçen ve hipofiz bezinde sonlanan portal venleri oluşturur. Nöroendokrin sistem, hipofiz hormonlarının yanı sıra hedef organ hormonlarının seviyelerini düzenleyen bir dizi feedback döngüsüne dayanmaktadır. Hedef organ hormonları, feedback döngüsünü tamamlamak için hem hipotalamus hem de hipofiz bezini düzenlemektedir (Weiss 2020).

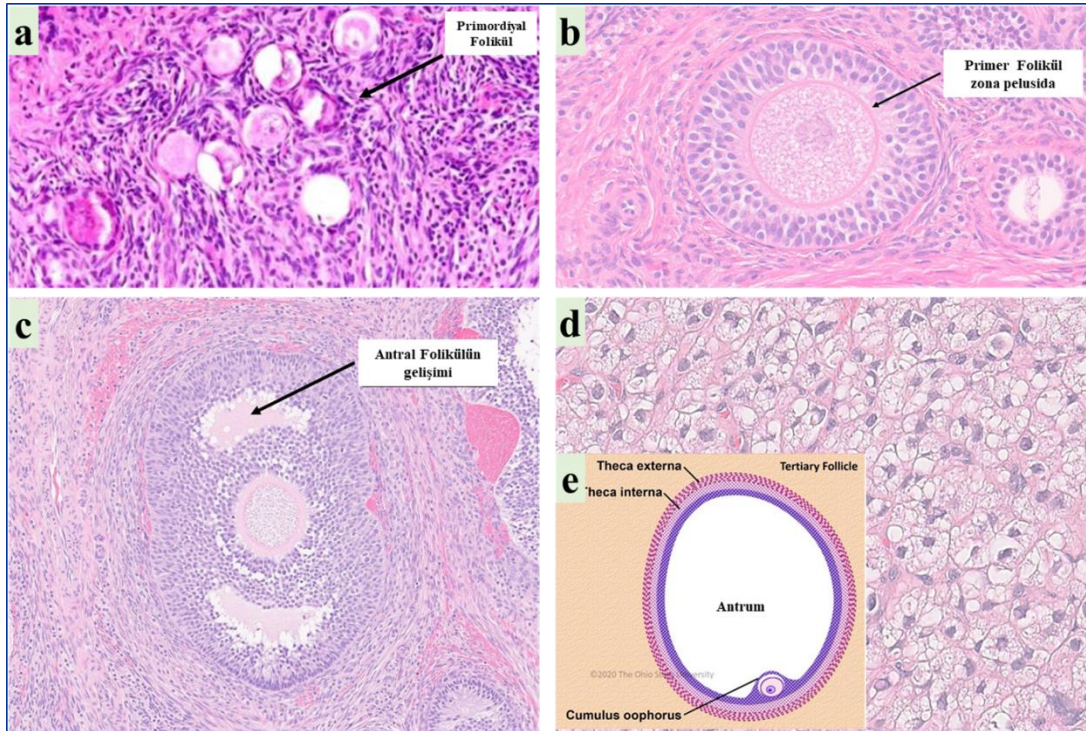
1.2. Köpeklerde Uterus ve Ovaryum Dokusunun Histolojisi

Uterusun kesitsel anatomisi endometriyum, miyometriyum ve perimetriyuma ayrılır. Endometriyum tipik olarak basit kolumnar epitel ile kaplıdır, bu epitel, lamina propriya adı verilen gevşek bir kollajen dokuya dayanır. Mukoza altında, basit veya dallı tübüler uterus bezleri lamina propriadan submukozaya kadar uzanır. Miyometriyum, içte dairesel bir katman ve dışta uzunlamasına bir katmanda düzenlenmiş düz kastan oluşur. Düz kas tabakaları arasında belirgin bir damar tabakası bulunur. Perimetriyum en dıştaki tabakadır ve gevşek bağ dokusu, lenfatikler ve üstte mezotelyal yüzeye sahip küçük arterler ve damarlardan oluşur (Şekil 3) (Jennings ve Premanandan 2017).



Şekil 3: Köpek uterusunun histolojik yapısı; a: anöstrüs dönemindeki bir dişi köpeğin inaktif endometriyumunu çevreleyen uterus lümenini, b: erken östrustaki uterus endometriyumu (Schlafer 2012).

Ovaryumlar anatomik olarak korteks ve medulla olarak ikiye ayrılır. Ovaryumun kortikal yönü, gelişim sırasında yaşla birlikte skuamöz epitele dönüşen küboidal epitel ile kaplanır. Kortikal parankim, foliküller (oositler ve foliküler hücreler), interstisyel hücreler, lüteal hücreler ve kollajenöz bağ dokusu stromasından oluşur. Ovaryumun medullası, büyük arterler ve damarlar, lenfatikler, gevşek bir kolajen matris içine gömülü sinirleri içerir. Ovaryumda folikülün gelişimi, öncelikle gonadotropinlerin FSH ve LH etkisiyle yönlendirilen fizyolojik süreci kapsar. Foliküler gelişim sırası 1. primordial folikül, 2. Primer folikül, 3. sekonder folikül ve 4. Tersiyer (graaf) folikül şeklindedir (Şekil 4) (Jennings ve Premanandan 2017).



Şekil 4: Karnivorlarda ovaryumun histolojik görüntüsü; a: primordiyal folikül, b: primer folikül, c: sekonder folikül, d: korpus luteum, e: Graff folikülü ve hücresel yapısının şematize resmi (Schlafer ve Foster 2016, Jennings ve Premanandan 2017).

1.3. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) ve GnRH Reseptörleri (GnRH-R)

Hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksen, birbiriyle iletişim halinde olan bir dizi nöral ve endokrin dokudan oluşarak fertilitenin düzenlenmesinde iyi bir şekilde entegre olmuş bir birim olarak işlev görür. Bu fizyolojik eksenin temel organizasyonu yüksek oranda korunmuştur. Bu eksen kuşlar, sürüngenler, balıklar ve memeliler dâhil olmak üzere çok çeşitli omurgalı türlerinde reproduktif yetkinliğinin temelini oluşturur (Francis ve ark. 1993, Lake ve ark. 2008). Memelilerin reproduktif siklusları, hipotalamus, hipofiz ve gonadlar arasındaki karmaşık bir etkileşim tarafından kontrol edilir. Bu eksenin işlevini yerine getirmesinin merkezinde, hipofiz gonadotropunun; GnRH tarafından uyarıya uygun şekilde yanıt verme yeteneği yer alır. Reproduktif eksen içinde, GnRH sinyali, reseptörün bulunduğu ayrı membran bölmeleri aracılığıyla başlatılır ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların (ERKs $\frac{1}{2}$ (extracellular signal-regulated kinases) aktivasyonuna yol açar (Bliss ve ark. 2010).

Hipofiz, büyüme, stres, gelişme, iştah ve üreme gibi farklı fizyolojik süreçlerden sorumlu olan endokrin hormonları sentezleyen farklı hücre gruplarını içermektedir (Sower 2018). Bunların arasında gonadotropinler gonadal büyüme, farklılaşma ve steroid üretimi dahil olmak üzere gonadal fonksiyonların başlıca endokrin düzenleyicileridir (Kumar 2005).

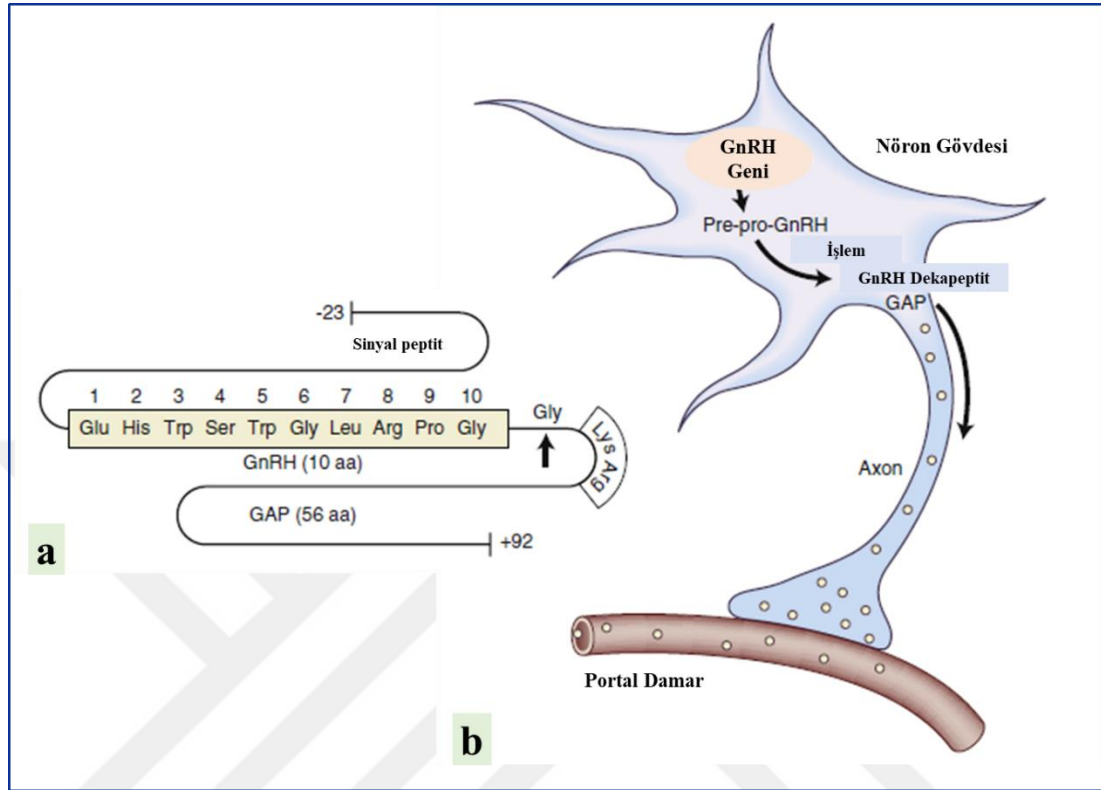
Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), pubertasın başlaması ile üreme fonksiyonunun devamlılığının sağlanmasında gerekliliğine ihtiyaç duyulan bir nöroendokrin dekaeptittir. İlk olarak memelilerde tanımlanan GnRH sinyal yolu, tüm omurgalı sınıflarında bulunur. Ayrıca GnRH homologları omurgasızlarda da tanımlanmıştır. GnRH, hipotalamik salgılatıcı hormon rolünün dışında, beynin belirli bölgelerindeki nöral aktiviteyi modüle etmek de dahil olmak üzere birçok fonksiyona sahiptir. GnRH'nın merkezi sinir sistemi içinde farklı yerlerdeki çoklu izoformları çeşitli fonksiyonel işlevlere aracılık eder (Whitlock ve ark. 2019).

GnRH'nın hayvanlarda tanımlanan üç izoformu bulunmaktadır; bunlar memeli GnRH-I, tavuk GnRH-II ve lamprey GnRH-III olarak isimlendirilmektedirler.

Bununla birlikte, GnRH-I, üremeyi düzenleyen ve kontrol eden ana peptit olarak kabul edilir (Mohamed ve ark. 2007). Tip I GnRH (GnRH-I) olarak adlandırılan ilk GnRH, üreme sürecinde çok önemli bir rolü olan bir decapeptittir GnRH'nin yapısı ve işlevi, amino asit dizilerinin farklılığına rağmen omurgalı evrimi boyunca büyük ölçüde korunmuştur (Abbara ve ark. 2015).

McCann, Schally ve Guillemin grupları tarafından yönetilen çalışmalar doğrultusunda 1971'de, milyonlarca domuz beyninden muazzam bir saflaştırma çabasıdan sonra, Schally ilk olarak gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) yapısını ***“pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂”*** olarak bilim dünyasına duyurmuştur (Baba ve ark. 1971). Yapılan bu keşif ile diğer hipotalamik hormonlar ile endokrinolojiyi dönüştüren ve tıbbın neredeyse tüm alanlarını etkileyen hipotalamik peptit nöroendokrinolojide büyük bir atılım olarak GnRH reproduksiyonun merkezindeki yerini almıştır. Fotoperiyot, metabolik ürünler ve besinler, büyüme faktörleri, stres, enfeksiyon ve yangı gibi bir dizi dış ve iç uyarının yanı sıra birçok merkezi ve çevresel büyüme faktörü ve hormon üreme sistemini düzenlemektedir. Bu uyarımlar, GnRH'nin biyosentezini ve salgılanmasını düzenlemek için beyin ve hipotalamusu entegre edilmiştir. GnRH, proteolitik enzimler tarafından bir öncü polipeptidden hipotalamik nöronlarda işlenir ve aksonlardan aşağı medyan eminensin dış bölgesine taşınan depolama granüllerinde depolanır (Seeburg ve ark. 1987, Fink 1988). Salgılanan GnRH, portal sistem yoluyla ön hipofiz bezine ulaşır ve burada gonadotrop hücrelerde GnRH reseptörü (GnRH-R) ile bağlantı kurar. GnRH-R'nin aktivasyonu, gonadotropinlerin, LH ve FSH biyosentezini ve salgılanmasını uyaran hücre içi sinyalleme makinelerini harekete geçirir. LH ve FSH daha sonra üreme hormon aksını düzenlemek için hipotalamus ve hipofiz bezinde pozitif ve negatif feedback ile gamet, peptit ve steroid hormonlarının üretimini için ovaryumu uyarır (Şekil 5) (Wu ve ark. 2021). Memelilerde, GnRH, ön hipofizden gonadotropların, FSH ve LH'nin sentezini uyarmak için sinir uçlarından hipofiz portal sistemine pulsatil bir şekilde salınır. Böylece, hipotalamik GnRH hücreleri ile hipofiz arasındaki iletişim, hipotalamik salgılayan ve inhibe eden hormonların hipotalamusun ön kısmındaki portal kılcal sistemi ile birleştiği medyan eminence adı verilen lokalize bir dolaşım sistemi yoluyla gerçekleşir. GnRH'nin memelilerde reproduksiyonu,

üremeyi ve fertil davranışları kontrol eden başlıca peptit olarak kaldığı düşünülmektedir (Kitahashi ve ark. 2013, Biran ve ark. 2015, Whitlock ve ark. 2019).



Şekil 5: GnRH'nın üretimi (a). GnRH genini, nöron gövdesinde GnRH öncesi bir öncü proteini kodlar. GnRH, nöron gövdesi içinde GnRH ve GnRH ile ilişkili proteine (GAP) yol açan proteolitik işlemle bu proteinden salınır. Hem GnRH hem de GAP bir akson içinde sinir terminaline taşınır ve portal dolaşıma salgılanır (b). Pre-pro-GnRH, 92 amino asitli (aa) bir proteindir. Biyolojik olarak aktif dekaeptit (amino asitler 1-10), 23-amino asit sinyal peptidi ile Gly-Lys-Arg dizisi arasında sıkıştırılır. Ok, proteolitik işleme bölgesini gösterir. C-terminali 56-amino asit peptidi, GAP üretmek için parçalanır. LHRH, luteinize edici hormon salgılatıcı hormon (gonadotropin salgılatıcı hormon 1) (Bulun 2008 revize etmiştir).

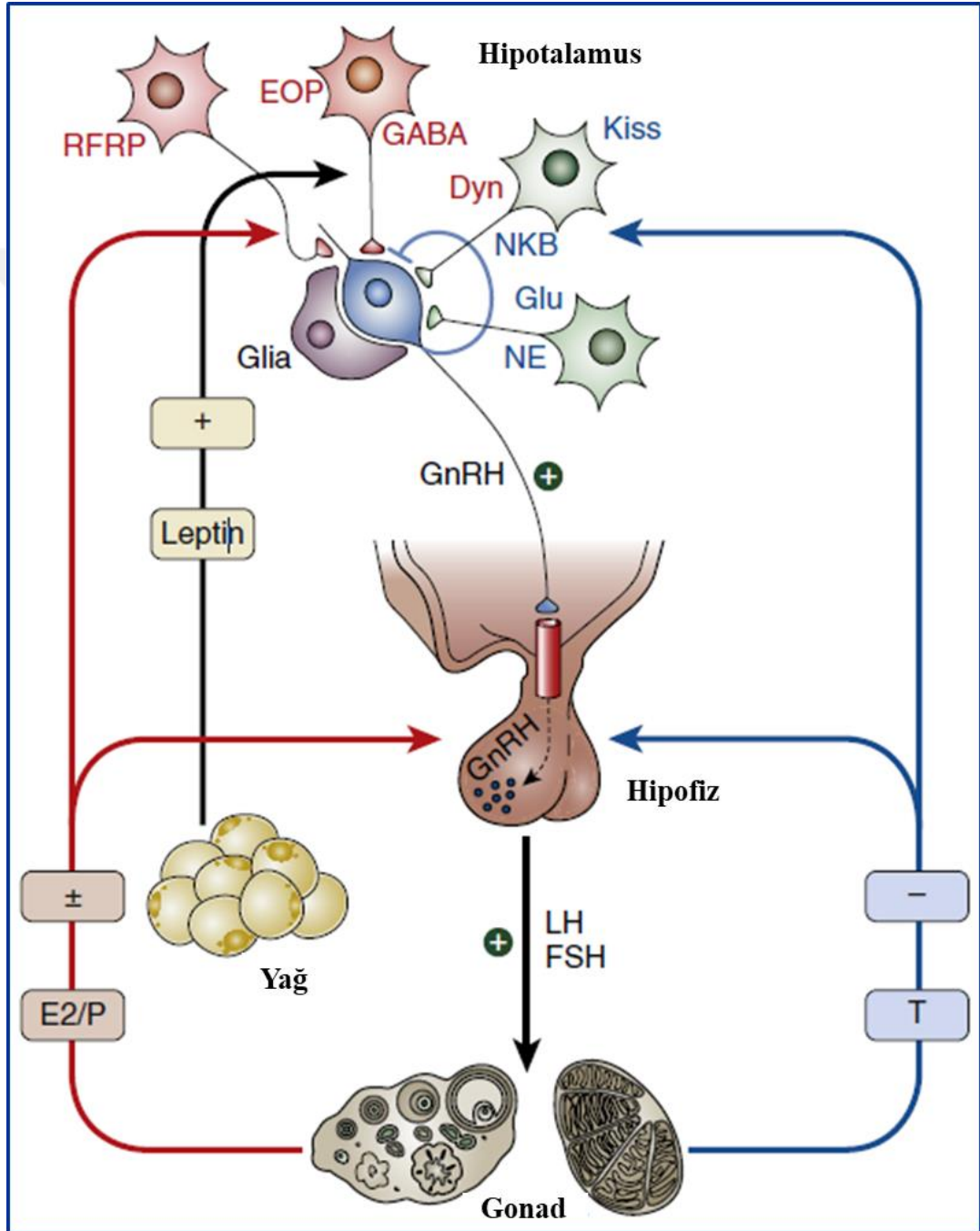
GnRH'yı düzenleyen çeşitli dış ve iç faktörler, bunu merkezi sinir sistemi ve hipotalamustaki karmaşık bir nörotransmitter ve nöropeptid ağı aracılığıyla yapar. GnRH salgısının bu ana modülatörlerine ek olarak, nöropeptid Y, pro-opiomelanokortin proteininin ürünleri, gonadotropin-inhibitör hormon (GnIH) ve nörotransmitterler (γ-amino bütirik asit ve glutamat gibi) de GnRH nöron aktivitesini düzenler. GnRH, ön hipofiz gonadotroplarındaki GnRH reseptörlerini hedeflemek ve gonadotropinlerin, LH ve FSH'nin biyosentezini ve salgılanmasını uyarmak için her 30 ila 120 dakikada bir yaklaşık 1500-2000 nöronun sinir uçlarından hipofiz portal

sistemine senkronize darbeler halinde salınır (Fink 1988). Her GnRH pulsu, bir LH salınımı pulsunu uyarır, ancak FSH pulsuları daha az belirgindir. Depolanan LH salgılanmada büyük ölçüde GnRH'ye bağımlıyken, FSH yapısal olarak salgılanma eğilimindedir ve dolaşımdaki seviyeler biyosenteze bağlıdır. LH pulslarının frekansı, insanlarda ve memelilerde ovulasyon dalgalanmasında en yüksek ve ovaryum döngüsünün luteal fazı sırasında en düşüktür seviyededir. LH ve FSH salınımının asenkron paternleri, GnRH puls frekansındaki değişikliklerden, gonadal steroid ve peptid hormonlarının GnRH'ye FSH ve LH yanıtları üzerindeki modüle edici etkilerinden ve iki hormonun yarılanma ömürlerindeki farklılıklardan kaynaklanır. LH'nın ovulasyonun uyarılması, tam gelişmiş foliküllerin luteinizasyonu ve folikülün teka hücrelerinde seks steroid hormonu üretiminin uyarılması başlıca işlevleri arasındadır (Millar ve Tello 2003).

Üremenin kontrolünde C-terminali Arg-Phe-NH₂'yi (RFamidler) içeren bir peptit ailesinin bulunması önemli bir keşif olmuştur. Kisspeptin ve gonadotropin-inhibitör hormon (GnIH), sırasıyla yeni uyarıcı ve üreme inhibitör düzenleyicileri olarak tanımlanan RFamid peptit ailesidir (Kriegsfeld ve ark. 2006).

Kisspeptin (KISS1) hipotalamik çekirdeklerde eksprese edilir ve pulsatil GnRH sekresyonunu düzenlemek KISSR aracılığıyla GnRH nöronları üzerinde etki eder (Smith ve ark. 2006). GnRH'nın kisspeptin tarafından düzenlenmesi çok önemlidir çünkü östrojen reseptörleri yoluyla östrojenik feedbackden GnRH nöronları değil, kisspeptin nöronları sorumludur (Pielecka-Fortuna ve ark. 2008). Hipotalamik GnRH nöronlarının özellikle seks steroidleri, gonadal dokudan gelen östrojen geribildirimini tarafından kontrol edildiği tahmin edilmektedir (Radovick ve ark. 2012). Östrojen geri bildirimi, östrus döngüsü, pubertasın başlangıcı ve fertilitate dahil olmak üzere üreme süreçleri için kritik öneme sahiptir (Wintermantel ve ark. 2006, Herbison 2020). Bu nedenle, GnRH nöronları üzerindeki östrojenik feedback etkisinin altında yatan mekanizma, son yarım yüzyılda üreme nöroendokrinolojisi alanında anahtar araştırma sorularından biri olmuştur. Son yirmi yılda üreme biyolojisi alanında birçok yeni nöropeptid tanımlanmıştır (Herbison 2020). Uterus endometriyumu, östrojen ve progesteronun son derece yüksek konsantrasyonlarda nükleer reseptörlerine sahiptirler ve bu hormonlara karşı oldukça hassastırlar. Biyolojik olarak aktif östrojen, estradiol,

endometriumun büyümesini indüklerken; progesteron ise bu östrojenik etkiyi sınırlar ve farklılaşmasını artırır. Östrojen veya progesteron seviyesinin azalmasını endometriyumun fonksiyonel tabakasının (stratum fonksiyonelis) kendini yenilemesi takip eder. Stratum bazalis ise östrojene tepki olarak tam rejenerasyon yeteneğine sahiptir (Şekil 6) (Bulun 2008).



Şekil 6: Hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksen. Transsinaptik ve glial sinyaller alan hipotalamik GnRH nöronları, GnRH pulslarını hipofizyal portal kılcal damarlara gönderir. GnRH,

gonadotropinlerin, LH ve FSH'nin pulsatil salgılanmasını uyarmak için hipofiz gonadotroplarındaki GnRH reseptörlerine bağlanır, bu da gonadların olgunlaşmasını ve işlevini uyarır. Eksen, pozitif ve negatif feedback'lar ile düzenlenir. HPG ekseninin işlevi, feedback kontrolünden sorumlu gonadal steroidleri içeren periferik sinyallerin düzenlenmesi sağlamaktadır. Testiküler testosteron (T), GnRH/gonadotropin sekresyonunu (negatif feedback) inhibe ederken, ovaryum steroidleri, özellikle östradiol (E2) ve progesteron (P), ovaryum döngüsünün aşamasına bağlı olarak hem negatif hem de pozitif feedback etkilerine sahiptir. HPG ekseninin diğer periferik düzenleyicileri, beyaz yağ dokusu (WAT) tarafından üretilen leptin gibi metabolik hormonlardır. HPG ekseninin kontrolünde yer alan bazı merkezi nörotransmitterler de gösterilmiştir: baskın inhibitör vericiler kırmızı ile gösterilirken uyarıcı faktörler mavi ile gösterilmiştir. GnRH nöronlarına yönelik uyarıcı sinyaller arasında KISS1 nöronları tarafından uyarım yer alır. Şekil, GnRH nöronlarına doğrudan ve dolaylı afferentler arasında ayırım yapmamaktadır. GnRH nöronlarına giden bazı sinyaller, basitlik için aynı nöronlarda gösterilmiştir. Bu, ARC'deki KISS1/NKB/Dyn nöronları için geçerlidir, ancak diğerlerinin çoğu için geçerli değildir. Glu, glutamat; GABA, gama-aminobütirik asit; EOP, endojen opioid peptitler; NE, norepinefrin; NKB, nörokinin B; Din, dinorfin; RFRP, RF ile ilgili peptitler (Pinilla ve ark. 2012).

GnRH, ön hipofizdeki reseptörüne (GnRH-R) yüksek bir özgüllüğe sahiptir ve GnRH-R düzenlemesi GnRH'nın kendisine bağlıdır (Katt ve ark. 1985, Clarke ve Pompolo 2005). GnRH reseptörlerinin fizyolojik düzenlemesinde hipotalamustan salınan GnRH pulsları, gonadotropların hücre yüzeyindeki GnRH reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanır. GnRH reseptör sayıları, GnRH puls frekansına ve pubertas ve östrus siklusu sırasında seks steroid yanıtına göre sayıları değişmektedir (Savoy-Moore ve ark. 1980). GnRH hipofiz bezinde GnRH-R aktivasyonu ile FSH ve LH salınmasına aracılık eden bir endokrin sinyal hormonu olarak işlev görür. LH ve FSH, gonatlardan androjenlerin, östrojenlerin, progesteronun ve inhibinlerin cinsiyete özgü üretimini doğrudan düzenler. Düzenleyici bu hormonal devre, kan-beyin bariyerinin, negatif feedback döngüleri oluşturan östrojen ve testosteron gibi steroid hormonlarına geçirgenliği ile bloke edilir (Meethal ve ark. 2005, Eisenegger ve ark. 2010).

Hipofizin ön lobundaki gonadotrop hücresi, hipotalamik GnRH sinyali ile eşey hücre rezervuarları ve gonatların steroid hormon üretkenliği arasındaki sistemin düzenleyicisi olarak kritik bir rol oynar. GnRH-R ekspresyonu gonadotropun belirleyici bir özelliğidir. GnRH'nin reseptörüne bağlanması, gonadotrop içinde karmaşık bir hücre içi sinyal iletim olaylarını tetikler; bu sinyal zincirleri, gonadotropin hücrelerinin GnRH stimülasyonuna genel fizyolojik tepkisini düzenleyerek, LH ve FSH sentezi ve salınımı sağlar. Böylece hem fonksiyonel hem de

anatomik anlamda, GnRHR ve eşleştiği hücre içi sinyal iletim sistemleri, bu nöroendokrin ekseninin “nöro-” ve “endokrin” bileşenleri arasındaki temel ara yüzünü oluşturur. Bu nedenle Gonadotropun hipotalamik GnRH'ye yanıtının altında yatan mekanizmalar reproduktif fonksiyonu ve fertilitenin moleküler temelini anlamamız için büyük önem taşımaktadır (Bliss ve ark. 2010).

1.3.1. Memelilerin Hipofizinde GnRH ve GnRH Reseptörünün Ekspresyonu

G proteini, GnRH aracılı sinyal iletim yolunda önemli bir rol oynar. GPCR (G protein-coupled receptors) süper ailesindeki diğer reseptörlere benzer şekilde, GnRH reseptörü çoklu G proteinlerine bağlanır. Gq/11 α , GnRH reseptörüne bağlı ana G proteindir. Dişi üreme sisteminde, GnRH reseptörü, ikinci ve üçüncü hücre içi döngüler yoluyla hücre içi sinyalleşmeyi başlatmak için bir Gia proteini ile birleşir. Palmitoilasyon, Gq/11 α proteininin bir tiyoester bağı yoluyla bir sistein kalıntısına 16 karbonlu bir yağ asidinin eklenmesini içeren ve GnRH reseptör aktivasyonundan sonra düzenlenen dinamik bir işlemdir. GnRH'ye yanıt olarak Gq/11 α 'nın reseptörle uyarılmış palmitoilasyonu, zamana ve doza bağlı bir şekilde meydana gelmektedir. Önceki çalışmalar, Gq/11 α proteininin palmitoilasyona uğraması için G proteininin aktivasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir (Stanislaus ve ark. 1997, Stanislaus ve ark. 1998).

Bir tirozin kinaz ve protein kinaz C'ye (PKC) bağımlı mekanizma yoluyla, GnRH reseptörü, ERK^{1/2}, c-Jun aminoterminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK dahil olmak üzere mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) basamaklarını başlatır (Johnson ve Lapadat 2002). Hipofiz dışı dokular ve hipofiz gonadotropoları arasındaki farklı GnRH sinyal yolları, bireysel eşleşmeden G proteinlerine doğru gelişebilir. İnsan hormonuyla ilişkili tümör hücrelerinde, GnRH agonistleri, boğmaca toksinine duyarlı G proteini aracılığıyla c-Jun aminoterminal kinazı simüle ederek aktivatör protein-1'i aktive eder (Grundker ve ark. 2001). Serum response element- E2 ile indüklenen transkripsiyonel reaksiyonu, MAPK sinyalleşmesinin ERa ile uyarılan aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (Grundker ve ark. 2004). Birlikte ele alındığında, hücreler tek tek hücre dışı sinyallere bir yanıt gösterir ve hipofiz gonadotropoları ve ekstra hipofiz

dokularında belirli gen ile ilişkili hücre büyümesini veya apoptozu ifade etmek veya inhibe etmek için tepki verir (Wu ve ark. 2021).

GnRH nöronları, gebeliğin ortasında yaklaşık olarak burun/koku alma alanında ortaya çıkar ve daha sonra GnRH nöronları beyindeki hipotalamusa göç ederler (Wray ve ark. 1989, Abbata ve ark. 2015). Daha ileri çalışmalar, HPG ekseninin, nazal bölgeden beyne, terminal sinir/olfaktör sistemin aksonları ile hipotalamusa doğru geliştirilen GnRH nöronları tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur (Casoni ve ark. 2012, Hutchins ve ark. 2013). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, konjenital anosminin patogenezinin muhtemelen GnRH kaynaklı olduğunu göstermiştir, bu da GnRH nöronlarının gelişiminin beyne ulaşmak için koku alma yapılarına bağlı olduğunu göstermektedir (Delaney ve ark. 2020). Çalışmalar, GnRH-II'nin memeli HPG ekseninde gonadotropin sekresyonunun kilit düzenleyicisi olmak yerine, esas olarak üreme davranışı ve enerji dengesinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (Kauffman 2004, Kauffman ve ark. 2006, Nishiguchi ve ark. 2012, Xia ve ark. 2015).

GnRH peptidinin amino- ve karboksil-terminal alanları, reseptör bağlanmasında anahtar bir rol oynarken, sadece amino-terminali, reseptör aktivasyonu ile ilişkilidir. Altıncı pozisyonundaki amino asit, Gly6, peptidin at nalı benzeri bir yapıya bükülmesini destekler, bu da her iki terminalin de reseptöre yakın olduğunu ve bağlanabileceğini gösterir (Millar ve Newton 2013). GnRH reseptörü, reseptör fosforilasyonu ve β - arrestin etkileşimi yoluyla bir reseptörle ilişkili proteinler ağını desensitizasyon ve içselleştirmenin GPCR (G protein-coupled receptors) düzenlemesi için gerekli bir alan olan bir karboksi-terminal sitoplazmik kuyruğundan yoksundur. GnRH reseptörünün yapısını anlamak, GnRH'nın hücrel aktivitelerini uyguladığı temel mekanizmaları aydınlatmak için önem arz etmektedir (Bockaert ve ark. 2003, Millar ve ark. 2004, Finch ve ark. 2009).

1.3.2. GnRH'nın Pubertasın Başlamasındaki Rolü ve Önemi

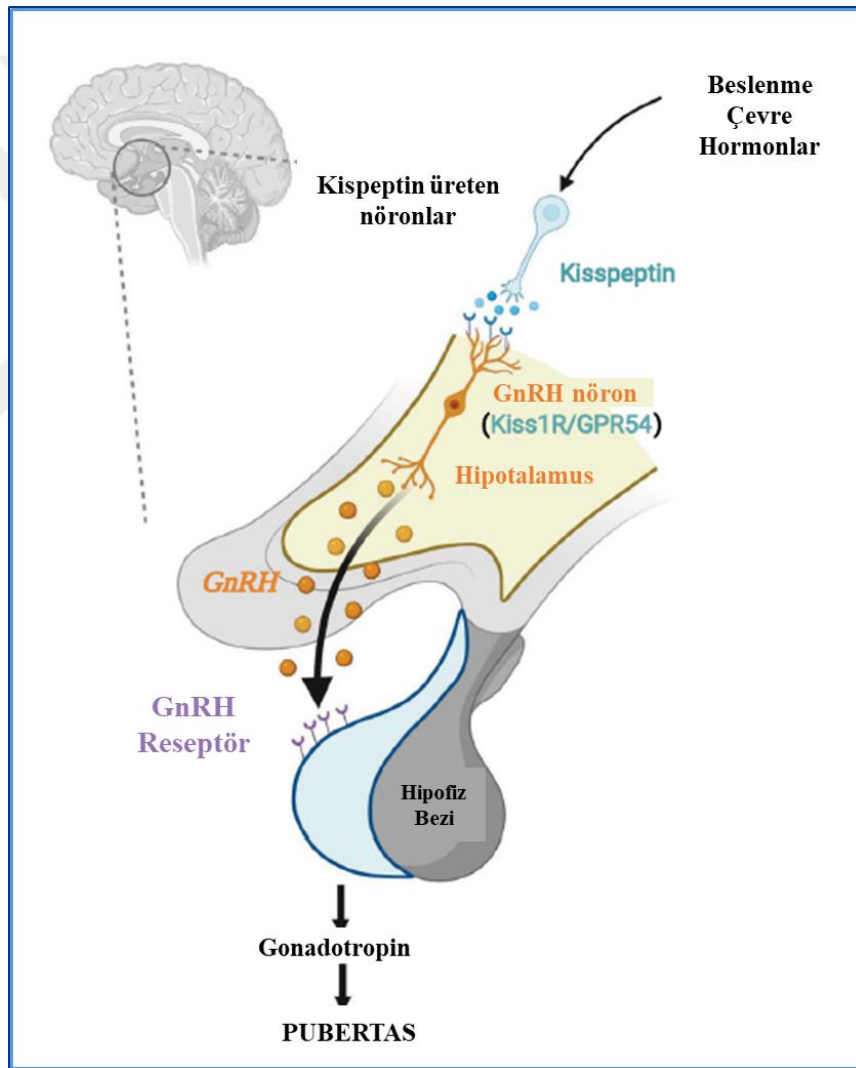
Memelilerin üreme biyolojisinin merkezi hipotalamus-hipofiz-gonadal (HPG) eksen tarafından kontrol edilir. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve kisspeptin içeren iki ana hipotalamik nöroendokrin hücre grubu, memelilerde HPG ekseninin

kontrolü için çok önemli rol oynamaktadırlar (Ogawa ve Parhar 2022). Memelilerde, hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) ekseninin uyarılıp harekete geçmesi pubertal olgunlaşmayı tetikler. Endojen ve eksojen (besin, endokrin ve çevresel uyarımlar) uyarımlara yanıt olarak nöroendokrin GnRH'nın hipotalamik nöronları, hipofiz bezini gonadotropinlerden LH ve FSH hormonu salgılaması için uyaran ve tetikleyici rol üstlenir (Herbison 2016, Wang ve ark. 2020). Bu hormonlar daha sonra gonadların olgunlaşmasını ve HPG eksenine geri sinyal vererek seks steroidlerinin üretimini teşvik etmek üzere dolaşıma katılırlar. GnRH nöronları, beyin dışında, nazal plakodda embriyonik olarak gelişme özelliğine sahiptir ve doğumdan önce hipotalamustaki son konumlarına göç ederler (Casoni ve ark. 2016). Ayrıca postnatal yaşam sırasında GnRH nöronları, "GnRH sinir ağı" oluşturmak üzere onlarla bağlantı kuran nöronal, glial (tanisitler ve astrositler) ve endotelyal hücreler ile diğer hücre popülasyonlarını toplar. Bu sinir ağı, zaman ve yerine göre GnRH üretimini ve salgılanmasını çok detaylı ve ince ayarlar. Bu nedenle, GnRH nöronlarının kendilerindeki veya GnRH sinir ağındaki aksaklıklara neden olan kusurlar, sağlıklı, sorunlu veya gecikmiş pubertal süreç ile sonuçlanacaktır (Sykietis ve ark. 2010, Clasadonte ve Prevot 2018, Lopez-Rodriguez ve ark. 2021).

GnRH sinir ağı içindeki hücreler arası iletişime, ağırlıklı olarak, hipotalamik devrelerin gelişiminde ve aynı zamanda dolaşımdaki seks steroidleri tarafından GnRH salınımının kontrolünde temel bir rol oynayan semafor sinyalizasyonu aracılık eder (Giacobini 2015). Hatalı semafor sinyali, hipogonadotropik hipogonadizme ve ovaryum nöroendokrin sinyalinde sektele neden olacaktır (Cariboni ve ark. 2015). GnRH nöronlarının pulsatil salınımını aktive ettiği bilinen en güçlü upstream pubertal sinyali, orta emineste GnRH nöronlarında G protein-bağlı membran reseptörü olan KISSR'ünü (GPR54 olarak da bilinir) aktive eden KISS1 geninin bir ürünü olan nöropeptid kisspeptindir (Şekil 7) (Kirilov ve ark. 2013, Clarkson ve ark. 2017). Dişi memelilerde, pubertal gelişim sırasında, GnRH pulslarının düzenlenmesi için kisspeptin, Norokinin-B ve dynorphin sinyalleşmesini içeren ortak bir ağ kurulur (Uenoyama ve ark. 2014).

Bu sinyal ağı, dişinin yetişkin yaşamındaki karmaşık üreme yetisini yönetmede esneklik sağlayacaktır (Garcia ve ark. 2019). Bu nedenle, sadece Kisspeptin tek başına

değil, aynı zamanda diğer nörotransmitterler ve hormonlar veya bunların kisspeptin ile birlikte ekspresyonu, GnRH nöronlarını farklı frekans ve zamana bağlı bir şekilde aktive edeceklerler (Simonneaux 2020). Memelilerde KISS10'un (Kp-10) uygulanması ile (olgun kisspeptinler parçalanır ve minimum aktif bölgesi olan dekapeptitlerdir) ile dolaşımdaki GnRH seviyelerinde güçlü bir artışa neden olabilmektedir (Messenger ve ark. 2005). Pubertal süreçte önemli olarak ya kisspeptin ya da Kisspeptin reseptörü (KISS-R) eksikliği, hayvanlarda puberte başlangıcının olmaması ya da gecikmesi ve insanlarda hipogonadotropik hipogonadizm ile sonuçlanmaktadır (De Roux ve ark. 2003, D'anglemont De Tassigny ve ark. 2007).



Şekil 7: Pubertasi kontrol eden nöroendokrin devreler (Guirado ve ark. 2022).

GnRH ve LH salgısının pulsatil salınımı, tüm memelilerde fertilité için gereklidir. GnRH nöron hücre gövdeleri arasındaki etkileşimleri içeren içsel bir puls

oluşturma mekanizması için çok az ikna edici kanıt mevcuttur. Bunun yerine, veriler arkuat çekirdek içinde yerleşik bir dışsal puls üreticinin varlığını destekler ve dikkate almış, kisspeptin nöronlarına ve bunların medyan eminens çevresinde yoğunlaşan GnRH nöron dendronlarına yansımalarına odaklanmıştır. Kemirgenlerde, kavisli kisspeptin nöronlarının bir alt popülasyonunun gerçekten de GnRH puls üretici olduğu sonucuna varmak için yeterli kanıt toplanmışken, diğer türlerdeki bulgular genellikle bu görüşle uyumludur ve kavisli/infundibular kisspeptin nöronlarının memeli GnRH puls üreticisini temsil ettiği görüşündedirler ([Herbison 2018](#)).

GnRH nöronu hipotalamusa göç ettiğinde, bir GnRH puls üretici etkinleştirilir. Doğum sonrası erken yaşamda, GnRH salgısı artar ve böylece “minipuberte” olarak adlandırılan gonadal hormon üretiminin geçici aktivasyonuna yol açar. Çocukluk döneminde gonadlar ekzojen LH ve FSH uyarısına yanıt verir ancak endojen pulsatil GnRH salınımı ergenliğe kadar baskılandığından sessiz kalır ([Weiss 2020](#)). Pulsatil GnRH salınımı erişkinlerde olduğu gibi infantil dönemde meydana gelir ve GnRH nöronları prepubertal dönemde pulsatil GnRH salınımı oluşturma kapasitesine sahiptir, spontan GnRH salınımindaki pubertal artış puberte zamanına kadar gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni, GnRH nöronları, bir GnRH puls üreten nöronal devre ve GnRH nöronlarına afferent nöronal girdiler ile ilişkili glial hücrelerden oluşan GnRH nöronlarının salgı aktivitesini düzenleyen kontrol mekanizmasının olgunlaşmamış olmasından kaynaklanmaktadır ([Herbison ve Plant 2018](#)).

GnRH salınımının pulslarının, çoklu GnRH nöronları arasındaki etkileşimin bir sonucu olduğu öne sürülmüştür. Çoklu GnRH nöronlarının merkezi eminesteki GnRH nöroterminal lifleri aracılığıyla iletişim kurması mümkündür ([Campbell ve ark. 2009](#)). GnRH nöronlarının senkronize pulzasyon aktivitesi muhtemelen voltaj kapılı kanallar veya adenosin trifosfat (ATP) gibi kimyasal sinyaller yoluyla glia gibi nöronal olmayan hücreler yoluyla gerçekleşse de, nöroterminal liflerdeki GnRH'nin, GnRH nöronları arasındaki iletişimin bir aracısı olmasını mümkün kılmıştır ([Herbison ve Plant 2018](#)).

Pubertasın başlangıcı birçok izin verici faktör tarafından düzenlenir. Farklı pubertal düzenleyiciler arasında, beslenme ve metabolik ipuçlarının pubertenin merkezi kontrolünde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir; kemirgenler ve insanlar

üzerinde yapılan çok sayıda çalışma, bir dişinin yağ rezervinin ergenliğin başlamasına izin vermek için kritik bir eşiği aşması gerektiğini göstermektedir ve böylece gebeliği desteklemek için yeterli somatik büyümenin elde edildiğine işaret etmektedir ([Frisch ve Revelle 1970](#), [Sisk ve Foster 2004](#)). Yağ dokusunda sentezlenen ve genel dolaşıma salınan bir peptit olan leptin, üreme nöroendokrin eksenine giden anahtar bir metabolik sinyaldir. Yapılan çalışmalar, leptin uygulamasının çeşitli hayvan modellerinde erken pubertası indüklediğini ve dolaşımdaki leptin konsantrasyonlarının pubertas yaşı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir ([Herbison ve Plant 2018](#)).

1.3.3. GnRH Analogları

Sentetik olarak üretilen GnRH'nin modifiye edilmiş şekilleri olan GnRH analogları, GnRH reseptörü ile etkileşime girerek hipofizden salınan gonadotropinlerin FSH ve LH salınımı üzerine etki göstermek üzere üretilmişlerdir. GnRH'nin dekapeptid yapısının modifikasyonları ile iki tip analog oluşturulmuştur; bunlar GnRH agonisti ve GnRH antagonistleridir. GnRH antagonistleri, GnRH reseptörlerini tamamen inhibe ve bloke ederek, FSH ve LH sekresyonunda ani bir düşüşe yol açarlar. Bununla birlikte, GnRH agonistleri, GnRH reseptörlerini aktive ederek, Flare-up oluşturarak FSH ve LH'nin aşırı sekresyonuna neden olarak dolaşımdaki yüksek konsantrasyonlara ulaşmasını sağlamaktadır. İlginç bir şekilde, ilk uyarıcı etkiden sonra, tekrarlayan dozlar veya devam eden düşük seviyeli GnRH agonisti dozlaması, GnRH reseptörlerinin hipofiz gonadotropinleri üzerinde down-regülasyonuna ve daha sonra hayvanlarda östrusu baskılamaya neden olmaktadır ([Trigg ve ark. 2001](#)).

GnRH molekülünde kimyasal modifikasyonlar daha etkin ve yarılanma süresinin uzun olması beklentisiyle sentetik analoglara ilgiyi artırmış ve geliştirmeye odaklanmıştır. Bu modifikasyonlar reseptör afinitesini arttırarak ve reseptörlerin bozulmasını veya eliminasyonu azaltarak elde edilmiştir ([Tarlatis ve Bili 2004](#)). GnRH analoglarının agonist ve antagonistleri dahil daha fazla etki ve daha uzun etki süresi oluşturmak için doğal GnRH molekülünün amino asit sayılarının azaltılması ile üretilmiştir. Agonistlerin uzun süreli uygulaması, ilk uyarımdan sonra gonadotropin üretimini ve salınımını inhibe eden GnRH hipofiz reseptörlerinin duyarsızlaştırılması ve down-regülasyonu ile sağlanır. Ancak, GnRH antagonistleri gonadotrop GnRH

reseptörlerine bağlanır ve endojen GnRH ile etkin bir şekilde rekabet ederek hipofizin gonadal eksenini inhibe eder (Gobello 2007).

GnRH antagonist ve agonistleri, doğal GnRH molekülündeki amino asitlerin azaltılmasıyla üretilmiştir. GnRH'nin 1971'den beri kimyasal özelliklerinin tanımlanması ve izolasyonundan bu yana, 3000'den fazla analog geliştirilmiştir (Karten ve Rivier 1986, Tarlatzis ve Bili 2004). GnRH analogları GnRH reseptörlerine yüksek afinite gösterecek şekilde tasarlanmıştır. İki amino asidin azaltılması ile güçlü agonistlerin üretilme çabaları doğal GnRH hormonundan 200 kat daha etkili olmasını sağlamıştır. Bu güçlü bileşikler “süper agonistler” olarak isimlendirilmişlerdir (Nestor 1984). Doğal GnRH'dan agonistler çok farklı olmasa da, antagonistler 10 amino asit dizilimindeki değişikliklerinde GnRH'den farklıdırlar (Jiang ve ark. 2001, Herbst 2003).

GnRH analoglarının hepsi gastrointestinal peptidaz bozulmasına duyarlıdır. Bu nedenle analogların oral uygulaması uygun değildir (%0,1 biyoyararlanım) ve parenteral uygulama gerektirirler (Chrisp ve Goa 1990, Padula 2005). Antagonistler, agonistler ile eşzamanlı olarak geliştirilmiş olmasına rağmen, ticari olarak elde edilebilir olmaları daha uzun sürmüştür (Gobello 2007).

1.3.3.1. GnRH Antagonistleri

GnRH antagonistleri yapısal olarak GnRH ile benzerlik gösteren dekapeptitlerdir ve doğal GnRH'dan birkaç amino asit farklılaşması ile reseptör aktivasyonu olmadan geri dönüşümlü GnRH-R bağlanmasına neden olur (Emons ve Schally 1994, Millar ve ark. 2004).

GnRH antagonistleri Cetrorelix, Ganirelix ve Teverelix, protein zincirinin 6 ve 8. pozisyonlarında sadece iki amino asit ile çok benzer bir yapıya sahiptirler (Millar ve ark. 2004, Millar ve Newton 2013). Bu farklı GnRH antagonistlerinin etkileri hiçbir zaman in vitro olarak kapsamlı bir şekilde karşılaştırılmamış olsa da, erken ovulasyonu önlemek için Cetrorelix ve Ganirelix kullanımının benzer klinik sonuçlara yol açtığı düşünülmektedir (Wilcox ve ark. 2005, Check ve ark. 2009). Ancak Teverelix klinik olarak potansiyel olarak yararlı olsa da henüz ticari olarak pazarlanmamıştır (Gianotti ve ark. 2003). GnRH ile yüksek bir benzerlik derecesine sahip olmalarına rağmen,

antagonistler arasındaki moleküler farklılıklar, reseptör bağlanması üzerine GnRHR'ye bağlı yollarda antagoniste spesifik etkilerin ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Bu da ligand ile indüklenen seçici sinyalleşme (LiSS) ile sonuçlandığı hipotezine yol açmıştır (Millar ve ark. 2008).

Sperduti ve ark. (2019), yapmış oldukları çalışmada GnRH kaynaklı hücre içi iletimdeki reseptörleri; in vitro inhibe etmede GnRHR eksprese eden hücre dizilerindeki gen dizilimlerini, Cetrorelix, Ganirelix ve Teverelix'in gen dizilimleriyle karşılaştırmışlardır. Yapılan bu çalışma, GnRH antagonistlerinin yapı-işlev ilişkisi hakkındaki bilgileri geliştirir ve kişiselleştirilmiş klinik uygulamalar için ilaç geliştirmede faydalı sonuçlar sağlayacağı düşünülmektedir. Antagonistin inhibisyonundaki hücre içi Ca_2 artışı, etkilerini değerlendirmek ve optimal GnRH dozunu bulmak için doz-cevap uygulamalarına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Böylece, Ca_2 biyosensorexpressing hücrelerinin artan GnRH konsantrasyonları ölçmüştür (Turgeon ve ark. 1996).

GnRH antagonistleri, GnRH'nın moleküller spesifik zar reseptörlerine bağlanabilmek için GnRH molekülleri ile başarılı bir şekilde yarışır. Antagonistler GnRH reseptörlerine bağlanarak, reseptör blokajını sağlayarak gonadotropinlerin salınımını baskılar. Hayvanın türü ve cinsiyeti, bulunduğu siklus dönemi, preparatın dozu, uygulanma süresi ve sıklığı GnRH antagonistlerinin başarısını etkileyen önemli faktörlerdendir. GnRH antagonistlerinin agonistlere göre avantajı hızlı bir baskılanma sağlayarak flare-up'ın meydana gelmesini önlemesidir. Uzun süreli kullanımlarda reseptörler üzerinde down-regülasyona neden olduğu bilinmektedir (Jiang ve ark. 2001, Herbst 2003, Gobello 2012).

Birinci kuşak GnRH antagonistlerinin köpeklerde ilk olarak etkili bir şekilde 1980 yılında kullanıldığı bildirilmiştir (Vickery ve ark. 1989). GnRH Antagonistleri agonistleriyle aynı zamanlı ortaya çıkmış olsa da ticari preparatlarının geliştirilmesi üretiminin pahalı olması nedeniyle daha fazla zaman almıştır (Sukcharoen 2000, Herbst 2003, Gobello 2012).

Sınırlı bir etki süresine sahip olan birinci nesil GnRH antagonistlerinin biyoaktif olmaları için günlük olarak uygulanmalarına ihtiyaç duyuluyordu. GnRH

reseptörünün yeterli şekilde baskılanmasını sağlamak için ise daha büyük dozlara gereksinim vardı (Vickery 1985). Hidrofobik özellikleri nedeniyle enjeksiyon bölgesinde nodül oluşumu ve sınırlı çözünmeleri antagonistlerin önemli yan etkilerindendir. Ayrıca ödem ve anafilaktik reaksiyonlar, göstermesinde mast hücre degranülasyonuna (yerel yangılarda veya kimi alerjik durumlarda mast hücreleri, bazofil lökositler vb. hücrelerin sitoplazmasında bulunan granüllerin hücre dışına bırakılarak kaybedilmesi), neden olan histamin ve diğer etkenlerin salgılanmasına bağlı olarak sistemik ve lokal alerjik yan etkiler gösterebilmekteydi. Son yıllarda üçüncü nesil antagonistlerin kullanılmasıyla düşük histaminerjik etki sağlanmış, proteolizis mekanizmasını baskılayan ve reseptör ilgisini artırılmış ve enjeksiyon bölgesinde yan etkiler gelişse bile 2 saatten daha az bir sürede geçtiği kaşıntı, kızarıklık ve şişkinlik gibi yan etkilerinin daha az olduğu belirlenmiştir (Vickery 1985, Sukcharoen 2000, Hoffmann ve Schuler 2000, Herbst 2003, Gobbello 2012).

GnRH antagonistlerinin gelişimi ile yıkımlanmasını bloke eden, reseptör duyarlılığını arttıran ve moleküllerin farmakokinetiğini uzatan, düşük histaminerjik özellikler elde edilmiştir (Herbst 2003). İnsanlarda 2 saatten az süren kızarıklık, kaşıntı ve şişme gibi hafif, geçici enjeksiyon bölgesi reaksiyonları gibi sınırlı yan etkileri vardır (Howles 2002, Herbst 2003). GnRH analoglarında kan biyokimyasında veya hematolojik değerlerde önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir (Tarlatzis ve Bili 2004).

1.3.3.2. GnRH Agonistleri

Doğal GnRH'nın yapısında bulunan aminoasitlerden 1, 2, 3, 6 ve 10 numaralı olanların seksüel siklus fizyolojisinde önemli fonksiyonlarda görev aldıkları bilinmektedir. Aminoasit dizilimlerinin görevleri farklıdır; gonadotropin salınımında 2 ve 3'üncü pozisyonundaki aminoasitler, enzimatik yıkımlanmada pozisyon 6'daki aminoasitler ve üç boyutlu yapının korunmasında ise pozisyon 1, 6 ve 10'daki aminoasitler görev alırlar. GnRH agonistleri bu aminoasitler üzerinde yapılan değişiklikler ile üretilmektedirler. Doğal GnRH'ya göre yarılanma ömrü daha uzun olan GnRH agonistlerinin üretilmesinde C terminaline glisin-amid yerleştirilmesi veya 6 numaralı aminoasidin pozisyonunun değiştirilmesi, 9 numaralı aminoasidin alkilasyonu ya da

10 numaralı aminoasidin silinmesi gibi farklı formülasyonlar kullanılmaktadır (Kutzler ve Wood 2006, Gobello 2012).

GnRH agonistleri GnRH reseptörlerinin aktivasyonunu sağlayarak, uygulama başlangıcında LH ve FSH konsantrasyonlarının artışı uyarıp, FSH ve LH düzeyini yükselterek geçici bir östrus uyarımı olarak tanımlanabilecek “flare-up” oluşumunu sağlarlar. Fakat düşük dozlarda uzun süreli kullanımı ile LH’nın pulsatil salınımı ortadan kaldırarak hipofizdeki gonadotropin reseptörlerinin down-regülasyonuna ve FSH/LH düzeyinin azalmasına neden olmaktadır (D’occhio ve ark. 2000, Trigg ve ark. 2001). Bu etkisi sayesinde FSH ve LH sentezinde azalma gerçekleştirerek spesifik bir etki oluşturup β -subunit mRNA üretimini baskılar (Aspden ve ark. 1997). Bu şekilde hipofizin GnRH’ya cevabı engellenerek gonadal steroidlerin konsantrasyonunda azalma sağlanarak foliküler gelişim engellenir ve FSH sekresyonu baskılanır. Foliküler gelişimin baskılanmasıyla östrojenin indüklediği için pozitif feedback mekanizması ve ovulasyon engellenir (Schäfer-Somi ve ark. 2014). Ayrıca, GnRH agonistinin sürekli olarak kullanımı köpekte Leydig hücrelerinin LH’ye duyarsızlaşmasına neden olmaktadır (Junaidi ve ark. 2007).

Agonistlerin uygulanmasını takiben gonadotropinlerin ve gonadal steroidlerin artmasına bağlı olarak, hormonal hastalıklar için kullanıldığında olumsuz yan etkileri olabilir. Aynı zamanda anöstrusteki ve prepubertal köpeklerde oluşan ilk flare-up sürecinin dikkatli bir şekilde yönetilmesi gerekmektedir (Gobello 2007).

GnRH agonistlerinin klinik kullanımları için önemli ilerleme, uygulama ve etken madde formülasyonuna bağlı olarak her 3, 6 veya 12 ayda bir intramüsküler veya deri altından kolayca uygulanabilen yavaş salınımlı agonistlerin geliştirilmesi ile elde edilmiştir (Weckermann ve Harzmann 2004). Günümüzde GnRH agonist formları büyük ölçüde geliştirilmiştir ve bunların hepsi dekaeptit yapıdadırlar bu nedenle oral yoldan biyoyararlanımları pratik olarak yaklaşık %0.1’dir. Bu agonistlerin kullanımlarına ilişkin verilerin bulunduğu fazlaca literatür vardır (Padula 2005).

Güncel olarak kullanılan GnRH agonistlerinin deri altı implant veya kas içi depo enjeksiyonları olarak kullanılabilen uzun etkili formülasyonlarının yanında, kısa etkili günlük enjeksiyonlarla uygulanabilen formülasyonları da bulunmaktadır.

Veteriner alanda en sık kullanılan agonistler; leuprorelin, buserelin, nafarelin, histrelin, goserelin, triptorelin ve Deslorelin'dir (Gobello 2012).

1.3.4. Köpeklerde GnRH Agonistlerinin Kullanımı

Köpeklerde üremenin denetlenmesinde östrus siklusunun kontrolünün önemli bir yeri vardır ve bu türlerde çiftlik hayvanlarında kullanılan üreme tekniklerinin ekzojen kontrolünü başarısız kılan benzersiz bir seksüel siklus fizyolojisi söz konusudur (Gobello 2007).

GnRH agonistlerinin kullanımından önce “güvenli ve etkili” olarak östrusun baskılanması veya uyarılmasında başarı şansı ne yazık ki oldukça düşüktü. Seksüel siklusun baskılanmasında kullanılan kontraseptif ajanlar hormonlara bağlı yan etkiler ve hormonal hastalıklara neden olduğu için son yıllarda yerini GnRH agonistlerine bırakmış ve bu alanda istenilen sonuçlar elde edilmiştir (Valiente ve ark. 2009). Veteriner hekimliği alanında en sık kullanılan agonistler; leuprorelin, buserelin, nafarelin, histrelin, goserelin, triptorelin ve Deslorelin'dir (Gobello 2012).

Kısa etkili agonistler uygulama süresince tekrarlaması gereken doz zorunlulukları ve köpeğin hospitalizasyonu nedeniyle masraflı ve klinik açıdan pratik olmamaları en büyük dezavantajlarıydı. Bu etkiler göz önünde bulundurularak GnRH agonistleri için önemli bir gelişme kaydedilmiş ve yavaş salınımlı agonistler deri altı ozmotik ya da silastik implantlar veya kas içi depo enjeksiyonları olarak uygulanmaya başlanmıştır. Bu formülasyonlar ile 3-12 arasında sabit dozda GnRH salınmaktadır. Köpeklerde kullanılmak üzere geliştirilen GnRH'nın uzun süreli salınım formülü buserelin-silastic implant ilk olarak 1996'da köpeklerde 10-14 gün boyunca uygulanmış ve proöstrusun uyarıldığı, spontan ovulasyon ve gebelikte başarı sağlandığı görülmüştür (Concannon ve ark. 1997).

GnRH agonisti olan Leuprolide intranasal spreyinin (Leupron Depot) östradiol 17- β ile birlikte kullanımı ile östrusu %71,4 oranında uyardığı, uygulama sırasında köpeklerin strese girdiği ve bunun dışında klinik olarak herhangi bir yan etkiye neden olmadığı belirlenmiştir (Hatoya ve ark. 2006).

Rota ve ark. (2003) yapmış oldukları bir çalışmada kabergolin ve buserelin kullanarak köpeklerde östrüsü indüksiyonunu karşılaştırmışlardır. Bir gruba kabergolin diğer gruba GnRH agonisti olan buserelin acetatın (S-suprefact) sulu çözeltisinden 1,5 µg/kg, sc, 11 gün boyunca ve 3 günde bir 0,75 µg/kg, sc, olarak kullanmışlardır. Yapılan çalışmada mevcut klinik koşullar altında, GnRH agonisti ile yapılan tedavinin kabergolin uygulamasına geçerli bir alternatif olarak önerilmediğine. GnRH agonistinin uygulanma yolunun kabergoline göre zor olduğuna ancak kabergolininde uzun süre kullanımının bir dezavantaj oluşturduğu görülmüştür.

Rubion ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmada GnRH agonisti olan 18,5 mg azagly nafarelin içeren Gonazon® implantı köpeklerde kullanmışlardır. İmplant sonrası klinik östrüs takibi ve aylık kan alarak kan serum P-progesteron konsantrasyonlarını ölçmüşlerdir. Ayrıca proöstrüs tespit edildiğinde, ovulasyonun meydana gelip gelmediğini belirlemek için 6 hafta boyunca kan örnekleri almışlardır. Kontrol grubundaki köpekler östrüs gösterirken implant grubundaki hiçbir köpeğin östrüs göstermediğini bildirmişlerdir. Östrüsün baskılanması nedeniyle Gonazon® kullanımını anlamlı bulmuşlardır. İmplant uygulanan bölgede herhangi bir yan etkinin meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Gonazon® implantın çıkarılmasından sonra, implantın çıkarılmasından yaklaşık 1, 4, 11 ve 13 ay sonra tedavi edilen köpeklerde östrüs tespit etmişlerdir. Üç köpeğinde östrüsü Gonazon®'un çıkarılmasından 14 ay sonra eCG / hCG uygulaması ile başarılı bir şekilde indüklemişlerdir. Gonazon® ile tedavi edilen köpeklerin ilk östrüs gösterme yaşları ortalama 25,5 (18-31) ay olmuştur.

Yapılan bir çalışmada köpeklere uygulanan azagly nafarelinin (16 mg) veya nafarelinin (32 mg) deri altı implantlarının ya da günlük enjeksiyonlarının pubertası ertelediği ya da östrüsü baskıladığı görülmüştür, uygulamadan yaklaşık 2-18 hafta sonra siklik aktivitenin yeniden normale döndüğünü bildirmiştir (Kutzler ve Wood 2006).

Bu uygulamalar dışında gonadotropin salınımının baskılanmasında GnRH karşıtı immünizasyon diğer seçenekler arasındadır. Köpek veya kedilerde GnRH'yı nötralize eden antikorlar GnRH aşısı ile immünize edildiği zaman sentezlenmeye başlar. Böylece GnRH'nın antero-hipofizdeki reseptörlerine bağlanması önlenerek gonadotropin sentezi baskılanır (Fürst ve ark. 1994). Ticari olarak geliştirilen

GonaCon™ ve Canine Gonadotropin Releasing Factor Immunotherapeutic® köpeklerle uygulanmış ve östrus baskılamada ve gebelik sonlandırmada başarılı sonuçlar alınmıştır (Munson ve ark. 2001, Chew ve Purswell 2010, Levy ve ark. 2011).

GnRH agonistlerinin pek çoğunun temininde, kalitesinde ve etki gücünde pek çok problemle karşılaşmıştır. Ancak bu GnRH agonistleri içinde Deslorelinin etkinliği kanıtlanmıştır. Deslorelin; GnRH'nın aminoasit diziliminde 2 aminoasidi değiştirilmiş olan D-Trp6-Pro9-des-Gly10 dizilimine sahip bir GnRH analogudur. İlk kez 2002 yılında Avusturalya'da erkek köpeklerde kontrasepsiyon amacıyla, daha sonra ise Yeni Zelanda'da kullanılmıştır. Birçok Avrupa birliği ülkesinde 2008 yılından beri ticari olarak bulunmakta ve kullanılmaktadır (Ponglowhapan 2011). GnRH analoglarının avantaj ve dezavantajları aşağıdaki tabloda sunulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1: Köpeklerde GnRH agonistlerinin avantaj ve dezavantajları (ACC&D report).

Avantaj	Dezavantaj
Erkek ve dişide fertilitiyi baskılar	Dişide implant yerleştirildikten sonraki iki hafta içerisinde geçici östrus uyarımı
Dişide davranışsal östrus bulguları tamamen ortadan kalkar / erkekte kastre edilmiş köpeklerdekine benzer davranış bulguları mevcuttur	Etkinin sürdürülebilmesi için tekrarlayan uygulamalar gerekli (özellikle ömür boyu kontrasepsiyon taleplerinde)
Depo enjeksiyonları, mikro küreler ve implantlar gibi farklı formülasyonlarda etkilidir	Ticari olarak uygun bir ürünün en az 6-12 ay etkili olması beklenir, sahipsiz hayvanlar için daha uzun etkinlik süresi gereklidir
Geri dönüşümlüdür; etki süresi bittiğinde üreme fonksiyonları devam eder	Yavaş etki etmeye başlaması (genellikle birkaç hafta) ve etki süresinin değişkenliği
Kolay uygulanır ve uygulama yerinde çoğunlukla yan etki yaratmaz	Yan etkiler (kas-iskelet sistemi gelişimi, genital sistem, kısa süreli davranış değişimi, tüy yapısı vb.) gözlenebilir

1.4. Deslorelin Asetat

GnRH analoglarının dezavantajları zaman içinde en aza indirilmiş ve deri altı implantlar olarak uygulanabilecek kısa ve uzun süreli etkiye sahip yavaş yavaş salınan analoglar geliştirilmiştir. Veteriner sahada bu analoglar arasında en yaygın kullanılan GnRH analogu olan Deslorelin (Suprelorin®), 2001 yılında geliştirilmiş ve 2002 yılında Avusturya'da ve Avrupa'da 2008 yılında ticari olarak kullanılabilir hale gelmiştir (Lucas 2014).

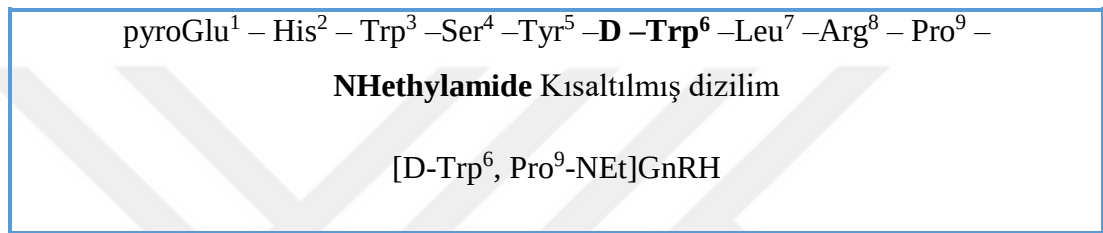
Bir GnRH superagonisti olan Deslorelin (Ovuplant®) ilk olarak kısıraklarda östrüsü desteklemede; ovulasyonun indüksiyonu ve zamanlamasında, subkutanöz kısa süreli implant olarak kullanımı onaylanmıştır. Güçlü bir GnRH agonisti olan Deslorelinin yavaş salınan düşük dozlu, bir implantı olan Suprelorin®'nin formülasyonu üretilmiştir ve 2002'den beri Avustralya'da ve bir yıl sonrasındada Yeni Zelanda'da erkek köpeklerde üremenin kontrolü için tescil edilmiştir. Deslorelin implant Avrupa Birliği'nde 2008'den beri piyasada bulunmaktadır. Siklus üzerine etkisi dışında hiperjenik gonadal eksen üzerindeki baskılayıcı etkisi nedeniyle androjene bağlı bozuklukların (örn. İyi huylu prostat hiperplazisi) ve hayvanlarda agresif davranışların kontrolünde Deslorelinin kullanımı tavsiye edilmektedir. Deslorelin kullanımı giderek küçük hayvanların çoğalması ile klinik olarak daha ilgili hale gelmektedir (Ponglowhapan 2011).

Deslorelin implantlar, köpeklerde östrüslerin yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik önemli bir alternatiftir. Deslorelin implant, yavaş salınan uzun etkili üçüncü nesil bir GnRH agonistidir. Erkek ve dişi köpeklerde rutin olarak klinik uygulamalarda ve araştırmalarda 15 yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Deslolerin implant dişi köpeklerde pubertası ertelemede oldukça başarılı görünmesine rağmen, flaerup etkisine bağlı östrusun baskılanmasına kıyasla östrusun indüksiyonunda, daha etkili olduğu görülmektedir (Kaya ve Ay 2017).

1.4.1. Deslorelinin Kimyasal Yapısı ve Formülasyonu

Deslorelin (CAS Numarası: 57773-65-6), GnRH hormonun bir nonapeptid analogudur. Doğal GnRH ile karşılaştırıldığında, Deslorelin amino asit bileşiminde 6 ve 9/10 pozisyonlarında kimyasal modifikasyonlara sahiptir. Deslorelinin amino asit sekansı aşağıdaki gibidir:

5-Okso-L-prolil-L-histidil-L-triptoksil-L-seril-L-tirosil-D-triptofil-L-leusil-L-arginil-N-etil-L- prolinamid amino asit sekansına sahiptir (Şekil 8) (EMEA Summary report 2002).



Şekil 8: Deslorelinin amino asit dizilimi (Silvestre 2003).

GnRH agonistleri için bu yapı tipiktir. Peptitin 6. konumundaki glisin, Deslorelin durumunda D-triptofan gibi bir D-amino asit ile ikame edilmiştir. Bu özellik dolaşımdaki Deslorelin'in yarı ömrünü artırarak avantajlı hale getirmiştir. Başka bir karakteristik değişim ise, GnRH-agonistinin (yani Deslorelin) reseptörüne afinitesini arttıran amino terminalindeki glisinin çıkarılmasıdır (Karten ve Rivier 1986).

GnRH'nın bağlanmasından önce reseptörlerin içselleştirilmesi ile mikro agregasyon gerçekleşerek in vitro olarak kalsiyum önceliği olmadan azalır (Hazum ve ark. 1980). Hücre dışı boşluktan kalmodulini (bir kalsiyum bağlayıcı protein) aktive eden hücrelere ilk olarak hızlı bir şekilde Ca^{++} iyonları akışı aktarılır. İkinci olarak, protein kinaz C (PKC), diasilgliseroller gibi membrana bağlı lipitin uyarılması yoluyla aktive edilir. Bu aktivasyon ile kalmodulin ve PKC aktivasyonu sağlanıp, bununla gonadotropinlerin kendi başlarına salınma yeteneği kazanmalarını teşvik etmektedir. Diasilgliseroller ayrıca PKC'yi uyarmanın yanı sıra Ca^{++} kalmodülünün etkisini de artırır, böylece gonadotropinlerin relaps oranını sinerjik olarak artırır (Conn 1986).

GnRH gibi, GnRH analogları da FSH ve LH gibi hipofiz gonadotropinlerinin salınımını kontrol eder. C-terminal glisinin doğal GnRH içinde uzaklaştırılması ve 6-pozisyon L-glisinin D-konfigürasyonunun bir amino asidi ile ikame edilmesinin, analogun arttırılmış biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğunu açıklar (EMEA Summary report 2002).

Suprelorin, 4.7 mg Deslorelin (Deslorelin asetat olarak) içeren 2.3 mm çapında ve 12 mm uzunluğunda silindirik şekilli bir implanttan oluşur. İmplant, köpeklere subkutan uygulama için amaçlanan toplam 50 mg ağırlığındaki katı, opak, beyaz ila soluk sarı bir silindirdir. Suprelorin, aktif madde olarak 5.85 mg / Deslorelin asetat %85.5 implant içerir. Yardımcı maddeler hidrojene palmye yağı, lesitin ve sodyum asetat susuzdur (European Medicines Agency,2010).

1.4.2. Deslorelinin Etki Mekanizması

Doğal GnRH'den 7 kat daha güçlü sentetik bir GnRH agonisti olan Deslorelin, hipotalamustan fizyolojik pulsatil GnRH salınımını taklit etmek için uygulanır. Sürekli veya uzun süre etkili GnRH agonistlerinin kullanılması, GnRH reseptörlerinde duyarsızlaşmaya neden olur ve bu da reseptörlerin down-regülasyonuna ve azalmasına yol açar (Gobello 2007, Fontaine ve Fontbonne 2011).

GnRH reseptörlerini arttırarak, kendisine karşı duyarlılık oluşturarak pubertası etkiler ve FSH ve LH salınımını tetikler (Spratt ve Crowley 1988). Daha düşük dozlar GnRH salınımını ön plana çıkartırken, daha yüksek dozlar her iki hormonun salınımını arttırır. FSH tepkisi benzerdir ancak LH'den daha düşüktür (Hoff ve ark. 1979).

Tek bir doz olarak uygulandığında, GnRH analogları LH ve FSH salınımını uyarır. Bu etkinin en duyarlı ve ilgili farmakodinamik yanıt olduğu varsayılmaktadır. Buna karşılık, çoklu dozlar veya sürekli düşük seviyedeki dozlamlar, doza bağlı bir şekilde LH ve FSH sentezinin ve salgılanmasının inhibisyonuna neden olabilir. Bu inhibisyonun gonadotropin salınımından sorumlu reseptörlerin duyarsızlaştırılmasından, hipofiz reseptör bağlanma kapasitesinin kaybindan ve hipofiz gonadotropinlerin dozuna ve zamana bağlı tükenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu etkiler, jinekolojik, endokrin koşullarda ve insanlarda onkolojide

GnRH analoglarının tıbbi uygulamalarının farmakolojik temelini sağlar ([EMEA Summary report 2002](#)).

Down-regölasyon GnRH reseptör komplekslerine, azaltılmış sayıda membran reseptörüne yanıt olarak kabul edilirken, desensitizasyon ise GnRH'nın bir salgılama sinyali (yani gonadotropin salımı) nedeniyle reseptöründen ayrılması olayıdır ([Vickery ve Nestor 1987](#)). Duyarsızlaştırma sonucunda GnRH fizyolojik pulsatil salınımı ortadan kaldırılır ve gonadotropin ve gonadal hormon salgılanması önlenir ([Gobello 2007, Fontaine ve Fontbonne 2011](#)). Flare-up etkisi, GnRH analoglarının uygulanmasını takip eden dönemde doğal GnRH salınımını taklit etmesi nedeniyle FSH ve LH salınımında bir artışa yol açar. Bu uygulama sonrasında östrus ve ovulasyonu uyartabilir ve gonadal supresyon 7-14 gün gecikebilir ([Lucas 2014](#)).

Üretici firma implantların biyo uyumlu olduğunu ve zamanla tamamen emileceğini ve bu nedenle implantın çıkarılmasına gerek olmadığını belirtmektedir ancak uygulamadan sonra implantın çıkarılması sorunu hala tartışmalıdır ([Kutzler ve ark. 2009](#)). Yine de implantların tedavi sonrası çıkartılması düşünülüyorsa, implantı çıkarılabileceği bir yere yerleştirmek daha kolay olacaktır. Genel olarak, implant uygulama alanları iki kürek kemiği, vestibüler mukoza, göbek ve arka bacakların içi arasında gösterilir ([Kaya ve Ay 2017](#)).

Deslorelin başlangıçta erkek köpeklerde kullanılmak üzere geliştirilse de daha sonra dişi köpeklerde de kullanılmıştır. Dişi köpeklerde kullanım alanları aşağıdaki gibi özetlenebilir: pubertasın ertelenmesi, östrus siklusunun kontrolü, kısırlaştırmadan sonra gözlenen üriner inkontinansın tedavisi, saldırganlığın azaltılması ve geçici sterilite sağlanması. Ayrıca, meme tümörlerinde metastazdan korunmada kullanılabileceği bildirilmektedir ([Romagnoli ve ark. 2009, Marino ve ark. 2014](#)).

1.4.3. Deslorelinin Prepubertal Dönemdeki Köpeklerde Kullanımı

Prepubertal dönemdeki köpeklerde kontrasepsiyon amacıyla ovaryohistektomi uygulanır. Ancak, bu dönemde yapılan ovaryohistektomi sonrasında epifiz plakalarının geç kapanması, idrar kaçırmaya, perivulvar dermatit ve juvenil vajinit gibi

kalıcı sorunlara neden olur. Bu nedenle, bu tip yan etkilerden kaçınmak için, puberte öncesi köpeklerde Deslorelin etkinliği araştırılmıştır (Schäfer-Somi ve ark. 2014).

Araştırmacılar Deslorelin implantın pubertası önlemek amacıyla en geç 4-5 aylık olana kadar uygulanması gerektiği konusunda hemfikirlerdir, çünkü daha sonra yapılacak uygulamalar pubertası uyarmaya neden olabilir (Trigg ve ark. 2006, Palm ve Reichler 2012, Kaya ve ark. 2013). Yapılan bir çalışmada prepubertal köpeklerde ortalama dört aylık bir dönemde yapılan Deslorelin implant uygulamalarının (4.7 ve 9.4 mg) bir “flare-up” cevabı oluşturmadığı ve kısa süreli uygulamalarında herhangi bir klinik yan etki olmadan güvenle kullanılabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, GnRH agonistlerinin, evcil karnivorlarda ovaryum aktivitesinin geri dönüşümlü kontrolü için umut verici bir alternatif gibi görünse de hormonal değişimleri ve özellikle sonraki pre-pubertal aşamalarda köpeklerin gelişimi ve sağlığı üzerindeki uzun vadeli etkileri anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu ifade etmişlerdir (Kaya ve ark. 2013). Köpeklerin uterusunda pubertas öncesi kisspeptin reseptör ekspresyonu daha önce araştırılmamış; sadece bir çalışma gebe köpek uterus ve trofoblast hücrelerinde kisspeptin ve reseptörünün ekspresyonu ile ilgili sonuçlar verilmiştir (Schäfer-Somi ve ark. 2017).

Deslorelinin prepubertal dönemdeki köpeklerde kullanımında pubertas yaklaşık 8 ila 24 ay ertelenebilmektedir. Trigg ve ark. (2006) 7 aylık yavrulara implant uygulandığında bir ay sonra östrus bulgularının ortaya çıktığı ve 4 aylık dişi yavrulara Deslorelin implant uygulandığında pubertasın ertelendiğini bildirilmiştir.

Marino ve ark. (2014) prepubertal köpeklere 4,5 aylıktan sonra her 4,5 ayda bir implant uygulandığında ve 18 aylık gözlem süresinin sonuna kadar östrus tespit etmemiştir. Ayrıca köpeklerde 4,7 mg Deslorelinin pubertası etkili bir şekilde ertelemeye ciddi bir yan etkisi olmadan kontraseptif olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Diğer araştırmacılar bu bulgulara ek olarak, pubertasın ortalama 4.2-4.3 aylık prepubertal dişi köpeklere tek bir uygulama ile 13 ila 24 ay arasında ertelendiğini bildirmiştir (Fontaine ve ark. 2011).

Kaya ve ark. (2015) prepubertal dişi köpeklere 4.7 mg ve 9.4 mg Deslorelin uygulayarak köpeklerin ağırlığını, cidago yüksekliğini, epifiz plaklarında kapanma

süresini ve dış genital gelişimi izlemişlerdir. Yapılan bu çalışma sonucunda, her iki Deslorelin dozunun pubertasi baskıladığı, köpeklerin ağırlığını etkilemediği, boyu ve dış genital organ gelişimini bozmadığı, ancak epifiz kapanma süresinin uygulama gruplarında önemli ölçüde daha uzun olduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, prepubertal dişi köpeklere (4.7 ve 9.4 mg) vajinal sitolojik ve hormonal değişime neden olmayan implantın ortalama 4 aylık bir yaş grubundaki köpeklere uygulandığını bildirilmişlerdir.

Yapılan güncel bir çalışmada geç pre-pubertal dönemdeki dişi köpeklere uygulanan Deslorelin implantın, E2'de güçlü bir artışla birlikte östrusu indüklediği, ancak bazı köpeklerde sadece hormonal değişimlerle ilişkili olarak vajinal sitolojide değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (Kaya ve ark.2019).

Kaya ve ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada 15 sağlıklı prepubertal dişi köpeğe Deslorelin implant uygulamışlar. İmplant yerleştirilen köpeklerin yalnızca 1/3'ü (n=5) östrüs göstermiştir. Östrusa giren dişi köpeklerde beklenen sitolojik değişikliklere ek olarak, östrüs göstermeyen dişi köpeklerde de (n=10) intermediyer ve süperfisiyal hücre indeksinde kademeli bir artışın olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yukarıda bahsedilen literatür kaynaklar eşliğinde, prepubertal dişi köpeklerde pubertasi geciktirmek için tek bir uygulama (8 ila 24 ay arasında) Deslorelin implant kullanımının 7 aylıktan erken yaşlarda ve hatta 4-5 ay arasında yapılabileceğini göstermektedir ve önemli klinik bozukluklara neden olmadan etkili ve güvenli bir şekilde uzama, ancak epifiz plak kapanmasında gecikmelere neden olmaktadır (Kaya ve Ay 2017).

1.4.4. Deslorelinin Köpeklerde Östrusun Baskılanması veya Ertelenmesinde Kullanımı

Yetişkin köpeklerde Deslorelin implant kullanılarak östruslar farklı sürelerde (2-27 ay) baskılanabilir (Sung ve ark. 2006, Trigg ve ark. 2006, Maenhoudt ve ark. 2012). Yetişkin dişi köpeklerde GnRH analogları ile seksual siklus ertelenmesindeki en büyük sorun Flare-up etkisidir. Deslorelin uygulamasının başarısı flare-up insidansı ile değişebilir. Anöstrus döneminde köpeklere yapılan uygulamalarda östruslerin %100 oranında uyarıldığı görülmüştür. Ancak Trigg ve ark. (2001) ile Romagnoli ve

ark. (2009) yapmış oldukları çalışmalarda diöstrus döneminde yapılan uygulamalarda ve özellikle progesteronun (P4)>5 ng/ml seviyesinde olduğu süre içerisinde köpeklerde östrus belirtilerini görmemişlerdir. Bu iki yazarın aksine Fontaine ve Fontbone (2010), P4 değeri >60 ng/ml olsa bile, implantların östrüsü uyardığını bildirmişlerdir.

Bir çalışmada, sadece bir köpekte (%20, 1/5) östrüsün bastırıldığını, diğerlerinde (%80; 4/5) kliniklerin proöstrus olduğunu ve östrus bulgularının klinik, vajinal sitoloji ve hormonal yönden uyarıldığını belirttiler ve P4 anöstrus dönemindeki köpeklerde tedavi flare-up'ı bastırmamıştır (Sung ve ark. 2006). Başka bir çalışmada benzer bir yöntem kullanarak flare-up'ı önlemediğinin ancak %90 oranında bastırdığını ve östrüsü 26-51 gün ertelediğini bildirmiştir (Corrada ve ark. 2006).

Jurczak ve Janowski (2018) yapmış oldukları çalışmada; preovulasyon döneminde Deslorelin implant uygulanan (n=10) ve spontan östrüs gösteren (n=10) köpeklerin ovaryum arterinin kan akımını izlemişlerdir. Çalışmanın bulguları, Deslorelin ile indüklenen siklularda, geç foliküler faz sırasında birkaç gün içinde ölçülen artan kan akışı ovulasyonun yaklaştığını gösterirken, yüksek kan akışı ise ovulasyonun yeni gerçekleştiğini göstermiştir. Spontan östrularda ise benzer şekilde, sol veya sağ ovaryum arterinde gerçekleştirilen Power Doppler ultrasonografik muayenede, ovulasyon öncesi dönemi saptamak için yalnızca tamamlayıcı bir araç olabilirken, ancak tam ovulasyon zamanını tahmin etmek için yeterli olmayacağını bulgulamışlardır.

Jurczak ve ark. (2020) yapmış oldukları pilot çalışmada; Deslorelin ile bir 3β-hidroksisteroiddehidrojenaz engelleyici kombinasyonu ile ovaryum fonksiyonun baskılanmasını araştırmışlardır. Çalışmada Deslorelin implant sonrası flare up ne derecede baskılanabileceği ve ortaya çıkabilecek yan etkileri amaçlamışlardır. Mevcut pilot çalışma, bu etkilerin 3β-hidroksisteroid-dehidrojenaz (HSD3B) bloker trilostan (T) ile eş zamanlı tedavi ile ne ölçüde bastırılabilceğini test etmek için tasarlanmıştır. T ile 6 saatlik aralıklarla yapılan tedavide, adrenal kortizol üretimini tamamen bloke edilmiştir. Bununla birlikte, LH artışına paralel olarak ve eş zamanlı, progesteron ve östradiol seviyeleri arttı ve üç köpeğin ikisinde proöstrus dönemindeki steroid seviyelerine ulaşılmıştır. Hormonal değişiklikler ilgili klinik semptomlar ile

bulgulanmıştır. Tüm gözlem periyodu boyunca, LH konsantrasyonlarının seyri, 4.7 mg Deslorelin ile tedavinin bir sonucu olarak hipofiz fonksiyonunun down-regülasyonunu göstermemiştir. LH verilerine dayanarak, 30 günlük tüm gözlem süresi boyunca ön hipofiz fonksiyonunun down-regülasyonu gözlenmediğini bulgulamışlardır.

[Borges ve ark. \(2015\)](#) yapmış oldukları retrospektif çalışmada, 4.7 mg Deslorelin implant ile tedavi edilen 17 ırktan 39 dişi köpeğin implant sonrası uyarılmış ve spontan östruslar ile ilgili veriler toplamışlardır. Bu verileri ovulasyon oranı, gebelik oranı ve bir batında doğan yavru sayısı oluşturmuştur. Yapılan çalışmada 4.7 mg Deslorelin implantı köpekleri gruplara ayırarak uzun süre, kısa süre, re-implantasyon ve spontan östruslara göre gruplandırılmıştır. Genel olarak, 4.7 mg Deslorelin implantı ile yapılan tedavilerin uzunluğu (kısa ve uzun tedaviler) dişilerin sonraki fertilitede ovulasyonun, genel gebelik oranı, tedavi sonrası ilk spontan kızgınlıktaki gebelik oranı veya bir batında doğan yavru sayısı açısından etkilemediği görülmüştür. Bu bulgulara göre Deslorelin implant ile yapılan tedaviler fertilitayı olumsuz yönde etkilemediğinden Deslorelin implantın fertilité üzerine yan etkisinin daha az olabileceğini ortaya koymuştur.

1.4.5. Deslorelinin Yan Etkileri

Deslorelin çok sayıda araştırmacı tarafından güvenli ve etkili bir yöntem olarak sunulmuştur. Ancak veteriner hekimliği alanında sadece birkaç eser bulunmaktadır. Ovaryum kistleri, uzamış östrus, uterus patolojisi, idrar kaçırma, foliküler anormallikler, juvenil vajiniti, laktasyon stimülasyonu, kusma, sistit ve alerjik reaksiyonlar gibi çeşitli yan etkilerle karşılaşılabilir ([Romagnoli ve ark. 2009](#), [Arlt ve ark. 2011](#), [Palm ve Reichler 2012](#), [Kaya ve ark. 2015](#)).

Genel olarak, köpeklere implantın yerleştirilmesinden sonra klinik veya sistemik bir değişiklik görülmemektedir. [Romagnoli ve ark. \(2009\)](#) yapmış oldukları çalışmasında bir köpekte %20, 1/5 oranında oluşan pyometra'nın flare-up etkisi ile tetiklenebileceğini düşünülmektedir.

Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmalarında tedaviye gerek kalmadan kendiliğinden iyileşen juvenil vajinit vakalarıyla karşılaşmışlardır ([Marino 2014](#)).

Kaya ve ark. (2015) kontrol grubundaki köpeklerde benzer bir gelişme tespit etmiş ve bunun tekrarlayan vajinal uygulamalardan kaynaklanabileceğini belirtmiştir.

Arlt ve ark. (2011) 7 yaşındaki bir köpeğe 4.6 mg Deslorelin implant yerleştirildikten üç ay sonra foliküler kist oluşumu ve bununla ilişkili uzamış östrus geliştiğini bildirmişlerdir. Kaya ve ark. (2015) rutin bir ovariohisterektomi sırasında 9.4 mg Deslorelin implant uygulanan bir prepubertal köpekte kistik foliküler dejenerasyonla karşılaştıklarını bildirmişlerdir (% 20, 1/5).

Brändli ve ark. (2021) yapmış oldukları retrospektif çalışmada 4,5 yaş altında ilk kez Deslorelin ile tedavi edilen 32 dişi köpekte tekrarlayan Deslorelin uygulaması sonrası yan etkilerin değerlendirilmesini amaçlamışlardır. Yapılan çalışmada Deslorelin implant sürekli gonadal supresyon elde etmek için birkaç kez tekrarlanmıştır. Beş köpekte implant sonrası hiçbir yan etki gözlenmezken altı köpekte ciddi yan etkiler meydana geldiği için tedavinin kesilmesine karar vermişlerdir. Ciddi yan etki görülen 6 köpekten; ovaryum tümörleri 3 köpekte, mukometra 1 köpekte ve üriner inkontinensiya 1 köpekte gözlemlendiği için histrektomi operasyonu yapmışlardır. Başka bir köpekte ise toplamda 3 uygulama ardından östrüsün indüklenmesi her implantın uygulanmasından sonra yeniden meydana gelmesi nedeniyle tedavi sonlandırılmış ve son implant çıkarılmıştır. 21 köpekte, küçük, kendi kendini sınırlayan yan etkiler gözlemlenmiştir. Diğer yan etkileri ise vücut ağırlığında artışlar ve azalışlar, uterus hastalıkları, kalıcı östrus, östrüsün uyarılması, yalancı gebelik, deri değişiklikleri olarak özetlemişlerdir.

Bu verilerin genele yayılarak yorumlanmasından kaçınılmalıdır. Kontrollü bir çalışma yapılmadığından ve sadece 32 dişi köpekte Deslorelin ile tekrar tekrar tedavi edildiğinden, özellikle güvenilirlik ve aynı zamanda etkinlik kesin olarak değerlendirilmesi mümkün değildir. Çalışmada bildirilen yan etkiler ile Deslorelin tedavisi arasında olası bir neden aramak için, örneğin ovaryum tümörü, uterus hastalıkları, üriner inkontinensiya ve meme tümörleri gibi patolojilerin sıklıkları, tedavi edilmemiş sağlıklı ve kısırlaştırılmış dişi köpekler dahil olmak üzere iki eşleştirilmiş kontrol grubunda yaş ve köpeğin cinside göz önüne alınarak değerlendirilmelidir. Bir köpekte Deslorelin kullanılmadan önce kapsamlı bir klinik muayene yapılmalı ve olası gebelik ve/veya üreme patolojileri ekarte edilmelidir. Olası

yan etkilerin erken teşhisini ve tedavisini doğrulamak için, köpeğin tedaviye her sunulduğunda düzenli sağlık kontrolleri yapılmalıdır. Ayrıca, hayvan sahipleri, endikasyon dışı kullanım ve olası yan etkilerin klinik belirtileri hakkında tam olarak bilgilendirilmesini önermektedirler (Brändli ve ark. 2021).

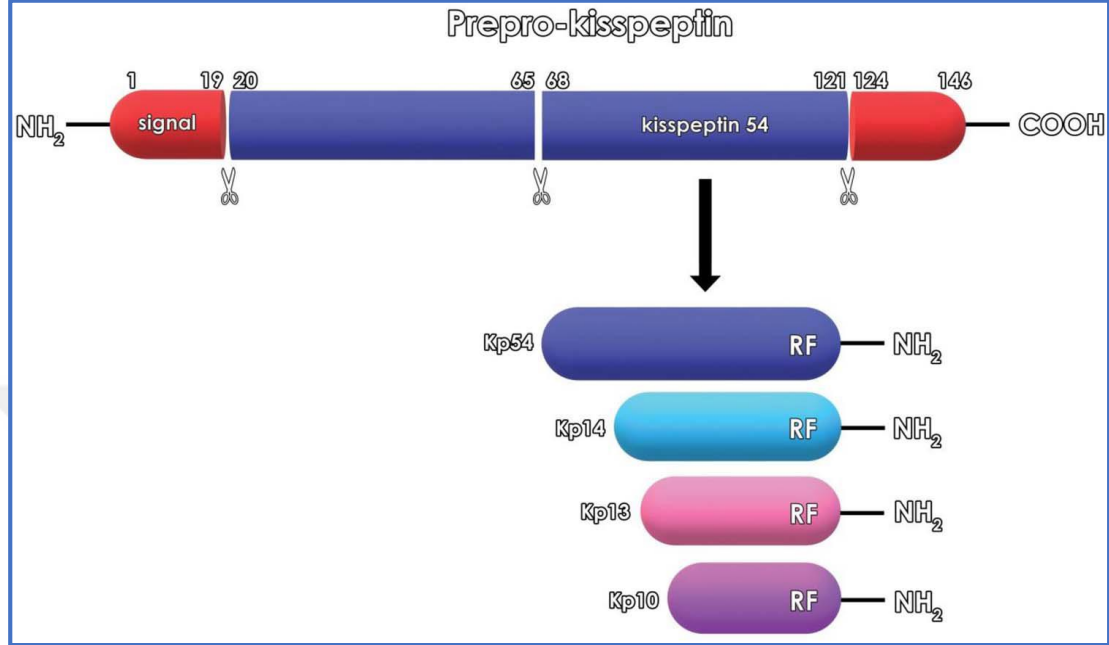
Borges ve ark. (2015) köpeklere 4.7 mg deslorein implant uygulayarak yapmış oldukları çalışmanın bulgularını Deslorelin implant ile yapılan tedavi sonrasında görülen östruslarda fertilizasyonu olumsuz yönde etkilemediği görülmüştür.

1.5. Kisspeptin

Kisspeptin, KISS1 geninin ürünlerini içeren bir peptit ailesi grubunda yer almaktadır. Keşfedilmesi 20 yıl öncesine dayanmaktadır. GnRH nöronlarını uyarması ile memelilerde reproduktif ekseninin aktivasyonunu kontrol eden ana faktör olarak kabul edilmektedir. Kisspeptinin GnRH nöronlarına GPR54 reseptörü aracılığı ile etki etmesi ile reproduksiyon üzerindeki etkinliği kanıtlanmıştır. Kisspeptin pubertasın başlaması ile reproduktif ekseninin aktivasyonunda rol oynar, yetişkinlerde reproduktif eksenin aktivitesini kontrol altında tutar ve bazı türlerde ovulasyonun tetiklenmesinde etkilidir (Duittoz ve ark. 2021).

Kisspeptin ilk olarak bir insan malign melanom hücre dizisinden anti-metastaz etkisi nedeniyle bir metastaz baskılayıcı gen olarak izole edildi ve metastin olarak adlandırıldı (Lee ve ark. 1996). İkinci bir araştırma grubu, kisspeptinlere ait olduğu için KISS1 peptidini adlandırmıştır. KISS1 geni 54 amino asit yapısına sahip olan karboksi-terminal olarak amidlenmiş bir peptidi kodlar ve endojen reseptör ligandı olmayan G- protein-bağlı reseptörün (GPCR) endojen ligandıdır, ayrıca AXOR 12, GPR54 veya KISS1R olarak da adlandırılır (Lee ve ark. 1999, Kotani ve ark. 2001). Kisspeptin, C-terminal eksen üzerinde kısa olgun peptidlere bölünebilen 145 amino asit çekirdek dizisi ile (54, 14, 13 ve 10) bir ön-hormon üreten KISS1 geni tarafından kodlanır (Pinilla ve ark. 2012). Memeli modellerinde ve insan hücrelerinde kisspeptini belirtmek için çeşitli terimler kullanılmıştır. Bu nedenle, İnsan Genom Organizasyonu Gen İsimlendirme Komitesi memeli türlerde kisspeptinin genleri ve protein ürünlerini isimlendirmede KISS1 olarak isimlendirerek, gen ürünlerine topluca Kisspeptinler tanılamasını yapmıştır (Şekil 9). Kisspeptin reseptörü, insan plasentasından G-proteine

bağlı GPR54 (kisspeptin reseptörü= KISS1R) için bir ligand olarak 2001 yılında izole edilerek insan ve insan olmayan türlerde GPR54 olarak tanımlanmıştır (Kotani ve ark. 2001, Gottsch ve ark. 2009).



Şekil 9: Kisspeptinlerin öncüsü olan prepro-kisspeptinin şematik gösterimi (Pinilla ve ark. 2012): KISS-54 (Kp54, KISS1), KISS-14 (Kp14), KISS-13 (Kp13) ve KISS-10 (Kp10). Kisspeptinler, Arg-Phe-NH₂ (RF-amid) peptid süper ailesine aittir ve KISS1R'ye (GPR54) bağlanmak için gerekli olan C terminalinde RF-amid veya RY-amid motifine sahiptir (Findeisen ve ark. 2011). (Şekil Pinilla ve ark. (2012) literatürden uyarlanmıştır).

Kisspeptin hücrelerinin GnRH nöronlarının steroid negatif-feedback kontrolünde kilit rol oynadığı ve bu hücrelerde gonadal seks steroidleri için hücrel reseptörlerin yüksek derecede ortak lokalizasyonunun olduğu görülmüştür. Araştırılıp incelenen tüm türlerde hem ARC hem de RP3V/preoptik kisspeptin hücrelerinin çoğu, östrojen reseptörünü (ER-alfa) (östradiolün GnRH sekresyonu üzerindeki negatif-feedback eylemlerinin sorumlu izoformu), progesteron reseptörünü (PR) ve androjen reseptörünü (AR) birlikte lokalize etmektedir (Wintermantel ve ark. 2006, Lehman ve ark. 2010).

KISS1'in gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) salgılanmasının kontrolünde temel bir role sahip olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır. KISS1 nöronları, KISS1'i GnRH sekresyonunun metabolik (leptin) ve gonadal (ER α) düzenlemesinin geçidine yerleştiren leptin ve östrojen reseptörü α (ER α) için uygun

reseptörlere sahiptir. Yakın zamanlarda, KISS1'in periferik reproduktif dokular üzerinde etkili olduğu kanıtlanmış, KISS1 ve KISS1R genlerinin foliküllerde (granüloza, teka, oosit), trofoblast ve uterusu ekspresyonu belirlenmiştir. KISS1 ve KISS1R proteinleri aynı dokularda bulunmuştur. KISS1'in folikül ve oosit olgunlaşmasında, trofoblast gelişiminde ve implantasyon ve plasentasyonda otokrin ve parakrin etkilerinin olduğu görülmektedir (D'occhio ve ark. 2020).

Yapılan bazı çalışmalarda, KISS1'in vitro oosit olgunlaşması ve blastosist gelişiminde de etkisinin olduğu görülmüştür. KISS1 araştırmasının bir sonraki aşaması, embriyonun hayatta kalması ve gebelik üzerindeki potansiyel faydaları araştırılması olacaktır. Bu çalışmalar muhtemelen proöstrus sürecini, erken dönem embriyo gelişimi, trofoblast hücrelerine bağlanma ve implantasyon süreci ve gebelik dönemindeki daha uzun süreli KISS1 tedavilerini kapsayacaktır. KISS1'in üreme dokularındaki doğrudan etkisinin daha derin bir şekilde anlaşılması ile embriyonun hayatta kalmasındaki süreçte bir sonraki adımda yapılabilecek değişikliklere ve yardımcı üreme teknolojisinin verimliliğinin iyileştirilmesine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Kisspeptin, GnRH'nın salgılanmasını etkilemek için beyinde hareket eder ve artık periferik reproduktif dokularında olduğu ovaryum fonksiyonunu, embriyo gelişimini, implantasyonu ve gebeliği doğrudan etkilediğine dair güçlü kanıtlar vardır (D'occhio ve ark. 2020).

Kisspeptinler, beyinden gonadotropin salgısı ile gonadal hormonlar tarafından seksüel farklılaşması, pubertasın zamanlaması, cinsel olgunluk ve üremenin kontrolü dahil olmak üzere, reproduktif ekseninin olgunlaşmasında ve işlevinde önemli düzenleyiciler olarak kabul edilmektedir. Kisspeptinlerin reproduksiyonun vazgeçilmez unsurları olduğu, fizyolojik rollerinde ötesinde potansiyel patofizyolojik ve terapötik sorunlar da oluşturabilecekleri düşünülmektedir (Roa ve ark. 2011).

1.5.1. Hipotalamik Kisspeptin ve Kisspeptin Reseptörleri

Kisspeptin hücre gövdelerinin iki ana grubu vardır: arkuat çekirdek (ARC) ve kemirgenlerin üçüncü ventrikülünün rostral periventriküler alanında olan (RP3V) ayrıca kemirgen olmayanların preoptik alanında daha küçük bir hücre nöron dizisine

sahiptir. Her iki nöron grubu da KISSR içeren GnRH hücre gövdelerine bağlanmış olup ve ARC hücreleri kisspeptin nöron popülasyonunu medyan emineste GnRH aksonlarına yansıtır. ARC kisspeptin nöronları, nörokinin B ve dynorphin içerirken, RP3V kemirgenlerde değişken bir yüzde oran ile galanin ve/veya dopamin içermektedir. Nörokinin-B ve Dynorphin'in GnRH pulslarının kontrolünde ve steroid negatif-feedback kontrolüne katkı sağladığı varsayılırken, galanin ve dopaminin rostral kisspeptin nöronlarındaki rolü tam olarak açıklanamamıştır. Kisspeptin nöronları, nöron ağırları ve KISSR, hipotalamus dışında diğer alanlarda yaygın olarak bulunur, ancak bu bölgelerdeki fizyolojik rol(ler)i henüz belirlenmemiştir. (Lehman ve ark. 2013).

KISS1 nöronlarının beyindeki lokalizasyonu rodentler, primatlar ve çiftlik hayvanları için detaylı bir şekilde gözden geçirilmiştir (Gottsch ve ark. 2006, Goodman ve Lehman 2012, Plant 2020). Kisspeptinin incelenen türler arasında, diensefalonda tanımlanmış olan; arkuat çekirdek (ARC) hücreleri ve preoptik alan hücreleri (POA) olmak üzere iki ana kisspeptin hücresi popülasyonu vardır. KISS1 nöronları ARC, anteroventral periventriküler çekirdek (AVPV) ve preoptik alanda (POA) yoğunlaşmıştır (Smith 2008, Hu ve ark. 2015). KISS1 nöron hücre gövdelerinin yoğunlaştığı yerde türlere göre farklılıkların olduğu görülmüştür (Goodman ve Lehman 2012). Arkuat çekirdek (ARC) hücre popülasyonu, memeli hipotalamusunda görülen en büyük kisspeptin hücre grubunu oluşturarak memeli türlerde en fazla sayıda hücreyi içermektedir (Lehman ve ark. 2010).

KISS1'in yapılan mRNA (mesajcı ribonükleik asit) ekspresyonu dişi farelerde amigdalada bulunmuş ve pubertas ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. KISS1 nöronlarının aksonal uzantılarında, hipotalamustaki GnRH nöron hücre gövdelerinin ve medyan eminesteki çevresinde GnRH nöron aksonlarının yakınında sinaptik terminallere sahiptir. KISS1, sinaptik terminallerde salınarak GnRH nöronlarından KISSR'lerine bağlanır (Rønnekleiv ve Kelly 2013).

KISS1 geni tarafından kodlanan kisspeptinin nöronal popülasyonları esas olarak hipotalamusa dağılmıştır. KISSR'ler, hipokampus, amigdala ve habenula gibi hipotalamik ve non-hipotalamik bölgeler de dahil olmak üzere beyinde geniş alana dağılmıştır (Sivalingam ve Parhar 2022). KISS1/KISSR'i çeşitli sinyal yollarına

bağlanarak aktive edebilir. KISSR'ü fosfolipaz C (PLC) yolunun aktivasyonu ve protein kinaz C'nin aktivasyonu ile sonuçlanan, inositol-(1,4,5)-trifosfat (IP3) ile hücre içi Ca^{2+} mobilizasyonunun birikmesine yol açarak G proteinine (Gq/11 α) bağlanır (Liu ve ark. 2008). KISS1/KISSR'i ayrıca mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK) ile özellikle ERK^{1/2}, p38 ve fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)'ın ilgili yollarını da aktive edebilmektedir (Castaño ve ark. 2009). KISS/KISSR sinirsel uyarımında, belirli bir fonksiyonun aktivasyonunun hücre tipine bağlı olduğunu ve buda kisspeptinin fonksiyonel rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır (Pasquier ve ark. 2014).

Memelilerde KISS1'in ortolog genleri, yüksek oranda korunmuş C-terminaline ait 10 amino asit sinyal dizileri ile belirlenmiştir. Memelilerde (insanlar, primatlar, kemirgenler ve primat olmayanlar dahil) sadece KISS1 geni bulunmuştur (Osugi ve ark. 2013). 2003 yılının sonlarında, KISS1R'nin regüle edilmemiş veya ekspresyon kaybının, üremenin nöroendokrin kontrolünde, özellikle pubertas ve hipogonadotropik hipogonadizmin başlangıcında beklenmedik rolünü sunan iki rapor yayımlanmıştır (De Roux ve ark. 2003, Seminara ve ark. 2003). Yayımlanan birçok çalışmanın ardından, özellikle çeşitli memeli türlerinde gonadotropların salınımını sağlamada hipotalamik kisspeptinin rolünü doğrulamak için farklı kisspeptin peptit fragmanları (Kiss1-10, Kiss1-13 ve Kiss1-54) kullanılmıştır (Gottsch ve ark. 2004, Navarro ve ark. 2005). GnRH nöronlarında eksprese edilen KISSR'ler yoluyla ARC'de nöronal popülasyon içeren memeli KISS1, foliküler gelişimi ve gamet olgunlaşmasını kontrol eden pulsatil GnRH salınımını düzenlemektedir (Irwig ve ark. 2004). Bununla birlikte, ARC ve AVPV'deki seks steroidine bağlı kisspeptin hücre popülasyonu, LH salgısını ve gonadal fonksiyonlarını düzenleyen GnRH salınımının pulsatif oluşumunda rol oynamaktadır (Matsuda ve ark. 2019).

KISS1R geninin mutasyonu ile insanlarda pubertasa girişte bozukluklar ve hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilendiren iki bağımsız yayının ardından üreme nöroendokrinolojisi alanında kisspeptinler 2003 yılı itibari ile önemli araştırma konuları arasında olmuştur (De Roux ve ark. 2003, Seminara ve ark. 2003). KISS1 reseptör geninde (KISS1R) meydana gelen doğal mutasyonların daha sonra idiyopatik hipotalamik hipogonadizm ve düzensiz pubertas ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bu

durum KISS1'in üremedeki rolüne ilgi duyulmasına yol açmıştır (D'occhio ve ark. 2020).

Bu nedenle, kisspeptinin cinsel gelişimdeki ve pubertasın başlangıcını belirlemedeki rolü memelilerde çok önemli görünmektedir. KISS/R'ü, omurgalı türlerin sosyal davranışlarda, duygularda ve metabolizmalarında bir role sahip olabileceği düşünülmektedir (Sivalingam ve Parhar 2022).

1.5.2. Gonadotropin Sekresyonunun Kontrol Mekanizmasında Kisspeptinin Rolü

Memeli türlerinde hipotalamik kisspeptin nöronlarının, pubertas üzerine ve GnRH'nın pulsatil salgısını düzenleyen nöronal ağda hayati rolünün olduğu birçok araştırmada bildirilmiştir. Ayrıca, hipotalamik kisspeptin üzerine yapılan yoğun araştırmalar, memelilerde pubertas, cinsel olgunlaşma ve üreme davranışlarının düzenlenmesindeki fizyolojik mekanizmasında rol alırken kuşlar ve memeli olmayan türlerde KISS1 ve KISS1R geninin bulunmadığı bildirilmiştir (Sivalingam ve Parhar 2022).

Kisspeptin-GPR-54'ün hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) ekseninin temel düzenleyicileri olarak keşfedilmesi ile son yıllarda üreme nöroendokrinolojisindeki yeni fizyolojik rolünü tanımlamada etkileyici ilerlemeler kaydedilmiştir. Birçok çalışma yapılmış ve devam ediyor olsa da Kisspeptin-GPR-54 etkileşimlerinin moleküler yönleri, hücre içi sinyalleşme ve hücre içi biyolojisi düzeyinde KISS1 ve GPR-54 genlerinin gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi alanlarda önemli boşluklar vardır. Kisspeptin agonistleri ve antagonistlerinin reproduksiyonda kullanılmak üzere farmakolojik alanda geliştirilerek klinik ve terapötik kullanımına da ihtiyaç vardır. Yapılan birçok çalışma KISS1'in mRNA'sında hücre yüzeyindeki reseptörlerdeki programlanmış bir artışa bağlı olarak GPR-54'ün memelilerde pubertasın kilit düzenleyicileri olduğunu göstermektedir. Kisspeptin salınım aktivasyonu ile GnRH'nın artan pulsatil salınımını artırır ve böylece reproduktif eksen harekete geçerek pubertal olgunlaşma sağlanır (Roseweir ve Millar 2008).

Hipotalamik kisspeptin nöronları GnRH'nın salgılanmasını düzenlemede etkin rol oynamaktadır (Aparicio 2005, Priyanka ve ark. 2018). KISS1 ayrıca periferik

üreme dokularında (ovaryum, uterus) beyin dışında da etki göstermektedir (Maranesi ve ark. 2019, Uenoyama ve ark. 2019).

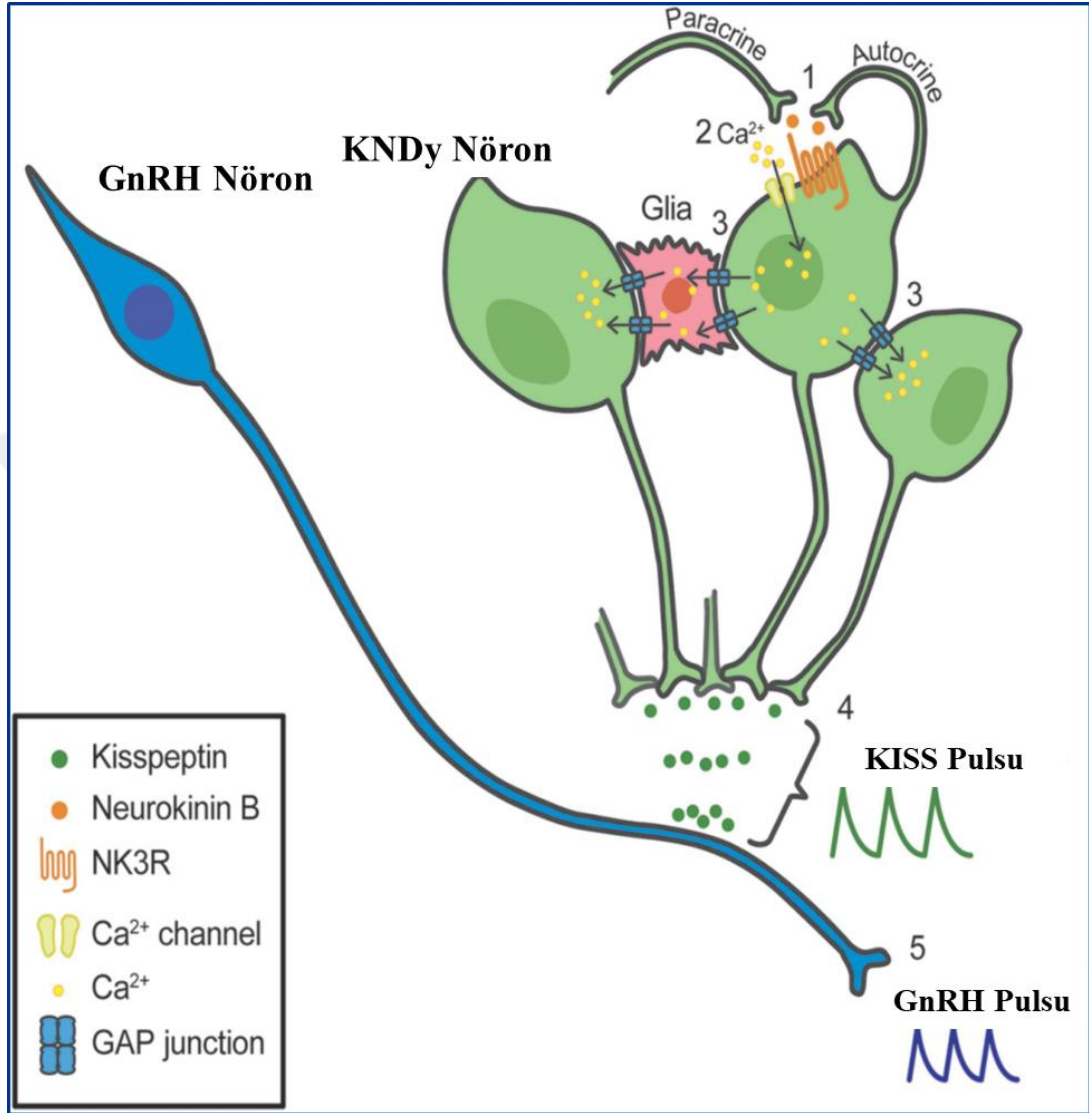
1.5.3. Kisspeptinin GnRH'nın Düzenleyicisi Olarak Pubertasın Başlamasındaki Rolü ve Önemi

Memelilerde pubertasın başlangıcının, pulsatil GnRH/gonadotropin salgılanmasındaki bir artışla zamanlandığı düşünülmektedir. Memelilerde pubertas başlangıcının altında yatan mekanizma henüz tamamen açıklanamamıştır. Pubertas başlangıcının zamanlamasında, memelilerde kisspeptin biyosentezi ve salgılanması için upstream düzenleyiciler tarafından kontrol edildiği varsayılmaktadır (Uenoyama ve ark. 2019).

Kisspeptinin önemli işlevi, pulsatil GnRH sekresyonunun düzenlenmesi ve pubertasın başlangıcındaki rolüdür. Bazal ön beyindeki GnRH nöronları, HPG ekseninin başlıca uyarıcı güçleri olarak bilinirler. Hipotalamik GnRH'nın ortanca eminensteki akson terminallerinden hipofizyal dolaşıma pulsatil salınımı ile LH ve FSH'nın pulsatil sekresyonunu başlatmak için ön hipofizdeki gonadotroplar üzerinde etki göstermektedir (Herbison ve ark. 2008, Constantin 2011). Bu hormonlar, sistemik dolaşım yoluyla, gonadal olgunlaşma ile erkek ve dişi gametlerin gelişimini destekler. Gonadal seks steroidlerinin GnRH salınımı üzerine negatif veya pozitif feedbacklerinin bulunduğu bilinmesine rağmen, GnRH nöronları östrojen reseptörlerinden yoksundur (Constantin 2011).

Nörokinin-B-NK3R ve/veya dynorphin A-KOR (kappa-opioid receptor) sinyalinin memelilerde otokrin ve/veya parakrin bir şekilde salgılanarak pubertasın başlamasını uyarmak için GnRH'nın belirli pulslarda üretimi için bir itici güç olarak rol oynadığı tahmin edilmektedir. GnRH ve Kisspeptinin salınım mekanizmasını özetleyecek olursak KNDy nöronlarından salgılanan nörokinin-B, Ca^{2+} kanallarını otokrin/parakrin bir şekilde açmak için NK3R'ye bağlanır, NK3R eksprese eden KNDy nöronlarına Ca^{2+} akışını tetikler, artan hücre içi Ca^{2+} , komşu KNDy nöronlarına ve glial hücrelere, bu nöronlar NK3R eksprese etmese bile boşluk bağlantıları yoluyla yayılabilirler, hücre içi Ca^{2+} artışının yayılması, ARC KNDy nöronlarının senkronize deşarjı ile sonuçlanacak ve daha sonra medyan eminenste

pulsatil kisspeptinin salgılanması ile hipofiz portal dolaşımına pulsatil GnRH'nın salgılanması uyarılacaktır (Şekil 10) (Navarro ve ark. 2011, Ikegami ve ark. 2017).



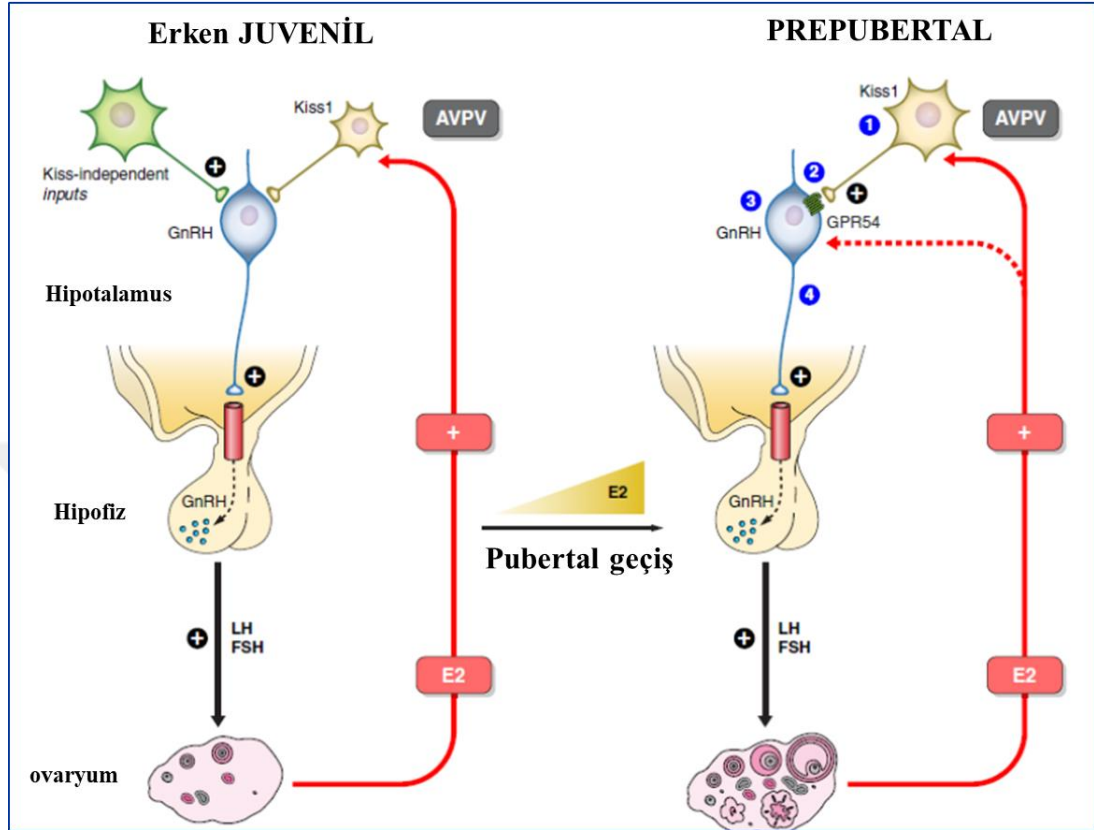
Şekil 10: Arkuat kisspeptin/nörokinin B/dynorphin A (KNDy) nöronlarının senkronize deşarjı ve ardından GnRH salgılanması için bir modelin şematik gösterimi. KNDy nöronlarından salgılanan nörokinin B (yeşil), takikinin NK3 reseptörünü (NK3R) otokrin/parakrin şekilde (1) bağlar ve NK3R eksprese eden KNDy nöronlarına Ca²⁺ akışını tetikler (2). Artan hücre içi Ca²⁺, komşu KNDy nöronlarına ve glial hücrelere (kırmızı) boşluk bağlantıları yoluyla, bu nöronlar NK3R eksprese etmese bile yayılabilir (3). Hücre içi Ca²⁺ artışının yayılması, KNDy nöronlarının senkronize deşarjına neden olur ve ardından pulsatil kisspeptin salgılanmasına neden olur (4). Ortaya çıkan pulsatil kisspeptin salgısı, medyan emineste pulsatil GnRH salgısını kontrol eder (5) (Uenoyama ve ark. 2019).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, hipotalamik arkuat çekirdekte bulunan kisspeptin/nörokinin B/dynorphin A (KNDy) nöronlarının memelilerde pulsatil

GnRH/gonadotropin salgısını tetikleyerek pubertasın başlangıcında anahtar bir rol oynadığını göstermektedir. Spesifik olarak, KNDy nöronları; nörokinin-B'nin kolaylaştırdığı ve dinorfin-A'nın inhibe ettiği, KNDy nöronlarının otokrin ve/veya parakrin şekillerde senkronize şekilde deşarjını engellediği GnRH'nın pulsatil üretiminin bir parçası olarak kabul edilmektedir. Kisspeptin, GnRH salgılanmasının güçlü bir sekretaloğu (salgı uyarıcısı) olarak görev yaparak salınımı ile memelilerde GnRH/gonadotropin pubertal dönemde salgılanmasındaki artış için esastır. Doğum-pubertas-yetişkin döneme kadar KISS1 geninin ekspresyonunu inhibe etmede önerilen mekanizmalar türden türe değişiklik göstermektedir; östrojenin negatif-feedback etkisinin, kemirgenlerde ve koyunlarda KNDy nöronlarında KISS1 geni ekspresyonunun inhibisyonunda kilit bir rol oynadığını, ayrıca östrojenden bağımsız inhibisyonunda kilit bir rol oynadığını öngörülmektedir (Uenoyama ve ark. 2019).

Bununla birlikte, GnRH nöronlarının upstream düzenleyicisi olan AVPV'nin kisspeptin nöronlarında östrojen reseptörü- α 'nın (ER2) tanımlanması ile Kisspeptin yoluyla östrojenler tarafından GnRH'nın dolaylı olarak düzenleme mekanizmasının olduğunu gösterir (Dubois ve ark. 2015). GnRH'nın KISS1 tarafından seks steroidleri ile düzenlenmesi, memelilerde Kisspeptinin üremedeki rolünü gösteren araştırmaların patlamasına yol açmıştır. Erkek ve dişi farelerde gençlerden yetişkinlere kadar AVPV nöronlarında KISS1'in mRNA'sında yüksek bir artışın meydana geldiği rapor edilmiştir. Kisspeptin yetişkin farelerde GnRH nöronlarını aktive eder ve doğum sonrası gelişim süreci boyunca duyarlı hale gelmektedir (Han ve ark. 2005). İnfantil-juvenil evrelerde kisspeptin reseptörünün bloke edilmesi veya ablasyonu ile pubertal başlangıcı bozulmaktadır. Erkek ve dişi farelerde KISS1 geninin susturulmasıyla, pulsatil GnRH ve LH dalgalanmasını tamamen bastırılmıştır. Bu durum, memelilerde pubertasın başlaması için KISS/R'nün pulsatif GnRH salınımı üzerindeki önemli rolünü ve gerekli olduğunu göstermektedir. Pubertal başlangıcın altında yatan mekanizma ve zamanlama belirsizliğini koruyor olsa da, nörokinin-B, dinorfin A ve melanokortin gibi genetik ve çevresel uyarımlar beyin merkezindeki hipotalamik Kisspeptin ile üreme eksenine bilgi aktardığı bilinmektedir (Uenoyama ve ark. 2015). Memelilerde, özellikle kemirgenlerde yapılan çok sayıda çalışma, Kisspeptinin, reproduktif bilgiyi entegre ederek pubertasın başlangıcını kontrol eden güçlü bir

hipotalamik GnRH sekretarioğu olarak hareket eden anahtar upstream aracısı olduğunu göstermektedir (Şekil 11) (Terasawa ve ark. 2013).



Şekil 11: Pubertal gelişimde KISS1 sistemindeki değişiklikler (Roa ve Tena-Sempere 2010, Tena-Sempere 2010).

Kisspeptinin gonadotropin salgılanması üzerindeki uyarıcı etkisi, kemirgen modellerinde GnRH antagonistleri tarafından bloke edilmiştir (Gottsch ve ark. 2004, Matsui ve ark. 2004). Yapılan birçok çalışmada, KISS1 veya GPR54 genlerinin susturulması ile hedeflenen kisspeptin veya reseptöründen yoksun birkaç kemirgen modelde, pubertal başarısızlık ve infertilite gösterdiği ve ayrıca KISS1 geni susturulan sıçanların hiçbir zaman pubertaya ulaşmaması gonadotropin salgısının ve pulse dalgalanmalarında var olan eksikliğini göstermektedir (Seminara ve ark. 2003, Messenger ve ark. 2005, D'anglemont De Tassigny ve ark. 2007, Chan ve ark. 2009, Uenoyama ve ark. 2015).

Bu bulgular, Kisspeptin-GPR54 sinyalinin, memelilerde GnRH/gonadotropin salgılanmasını ve pubertal başlangıcı kontrol eden mekanizma üzerinde önemli bir rol oynadığını ve Kisspeptinin memelilerde pubertasın başlangıcında GnRH sentezinden

ziyade GnRH'nın sekresyonunu uyarmada daha etkin role sahiptir ([Uenoyama ve ark. 2019](#)).

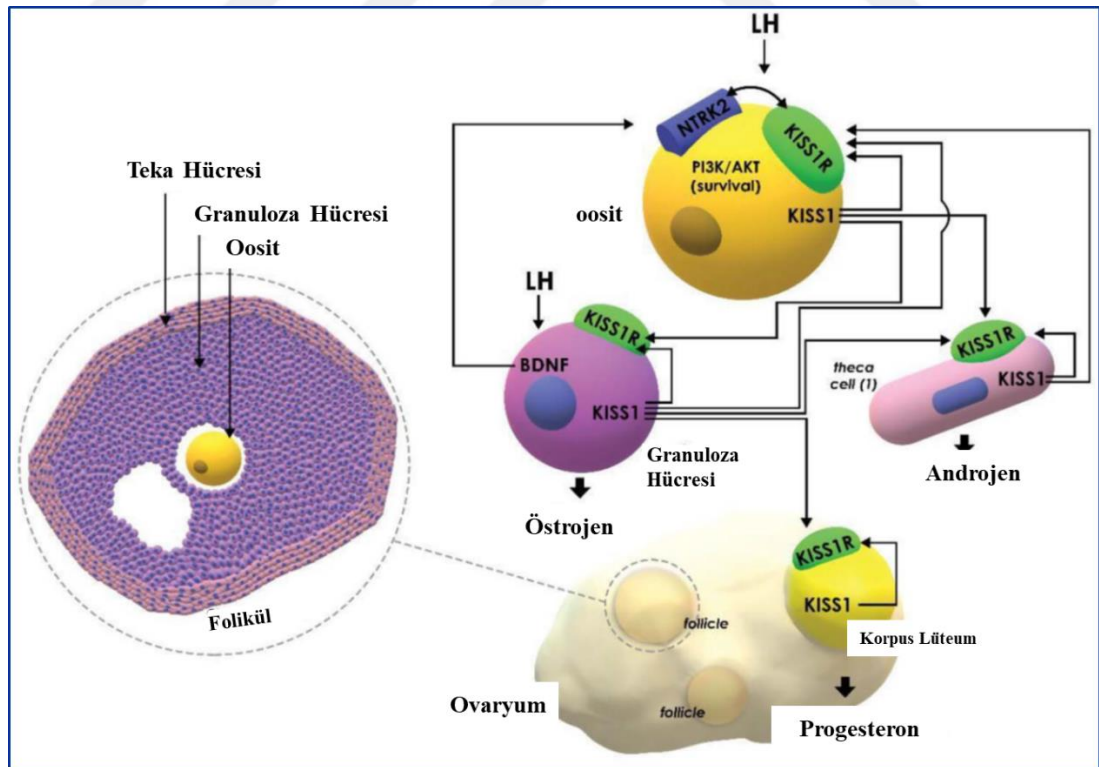
1.5.4. Kisspeptin'in Ovaryumdaki Rolü ve Hücresel Etkisi

KISS1 geni tarafından kodlanan Kisspeptinler, gonadotropin sekresyonunu uyarmak için öncelikle hipotalamik GnRH nöronları üzerinde hareket ederek ovulasyon ve fertilizasyonun kontrolü için gereklidir. Oositteki Kisspeptin sinyali, ovulasyonun doğrudan kontrolünde önemli bir fizyolojik rol oynar; Kisspeptin reseptörü Gpr54'ün oosit spesifik ablasyonu, farelerde erken ovarian yetmezliğin (POI: premature ovarian insufficiency) bazı özelliklerini özetleyen bir erken ovulasyon yetmezliği durumuna neden olur. [Ruohonen ve ark. \(2022\)](#) fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada kisspeptinin oosit sinyalinin kesilmesinin erken dönem ovulasyon başarısızlığında artışlara neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu veriler, ovulasyon sürecinin önemli yönlerine anlamada lokal olarak üretilen kisspeptinler ile oosit arasında ilişkinin olduğunu göstermektedir. Kisspeptin sinyalinin bozulmasının foliküler dinamikleri tehlikeye atacağını, folikül atreziyenin ve ovulasyonun bozulmasına neden olacağını işaret etmektedir.

KISS1 ve KISS1R genlerinin ekspresyonu ve KISS1 ve KISS1R proteininin varlığı, sıçanlarda, farelerde, Sibiry hamsterında, tavşanda, kedi, köpek, keçi, dişi domuz ve insan ve insan olmayan primatlarda bulunmuştur ([Gaytán ve ark. 2009](#), [HuZhao ve ark. 2019](#)). Ratlarda, prepubertal hayvanlarda KISS1 ve KISS1R ekspresyonu az sayıda bulunmuştur ve gonadotropin ile tedaviye yanıt olarak foliküllerin teka hücrelerinde ve luteal dokudaki ekspresyonu artmıştır ([Castellano ve ark. 2006](#), [Peng ve ark. 2013](#)). KISS1 ve KISS1R'nin foliküllerde (granüloza, teka, oosit) ve corpus luteumdaki ekspresyonu, KISS1 ve KISS1R proteinlerinin varlığı ile birlikte, lokal KISS1'in ovaryum fonksiyonunda önemli otokrin ve parakrin etkilere sahip olduğuna dair güçlü kanıtlar sağlar ([Ruohonen ve ark. 2019](#)).

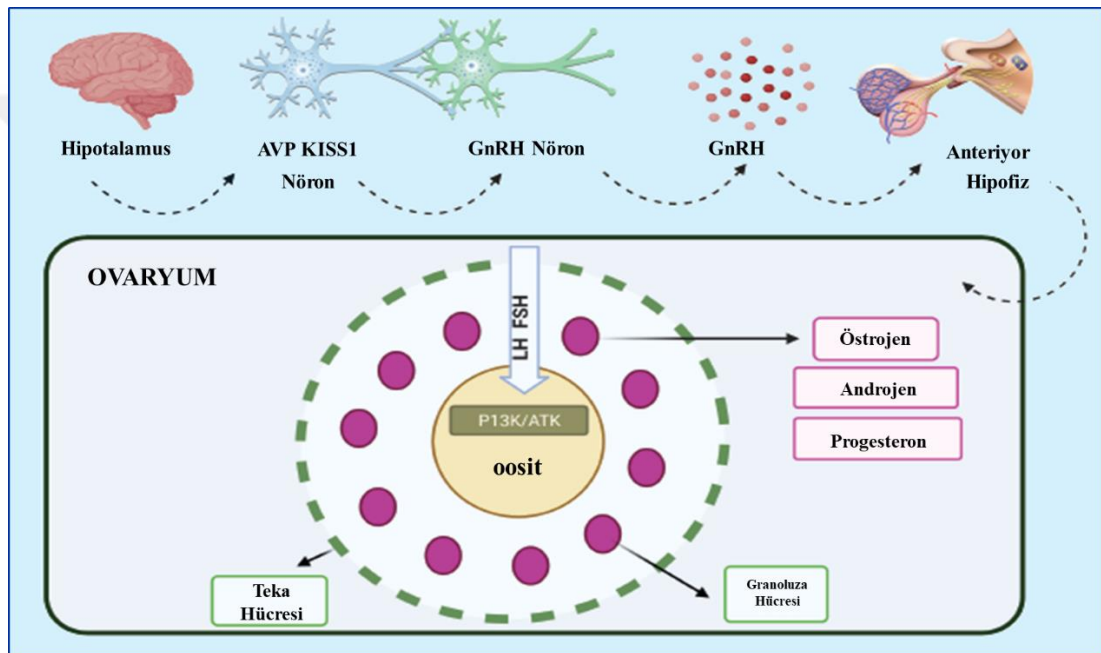
Kisspeptinin ve reseptörünün ovaryumdaki lokalitesinde farklı fizyolojik evrelerde birden fazla işlevi yerine getirdiği düşünülmektedir. Foliküler gelişimdeki rolü ovaryumdaki KISS1'in mRNA'sının bebeklikten pubertase kadar kademeli olarak artar ([Ricu ve ark. 2012](#)). Yapılan bir çalışmada, Kisspeptin uygulaması ile 6 ve 10

aylık sıçanlarda plazma anti-Müllerian hormonunu (AMH) arttırdığı görülmüştür. Ovaryum rezervinin bir belirteci olan AMH, esas olarak ikincil ve küçük sinüs folikülleri tarafından salgılanır ve negatif feedback ile primordial foliküllerin aktivasyonunu engelleyebilir (Baarends ve ark. 1995). Folikül uyarıcı hormon reseptörü (FSHR) foliküler büyümeden sorumludur, ancak kisspeptin izoproterenol (ISO, bir β -adrenerjik agonist) tarafından FSHR ekspresyonundaki artışı bloke edebilir (Fernandois ve ark. 2016). Reseptörün, nörotrofik reseptör tirozin kinaz 2'nin (NTRK2) ve ligandının, beyinden köken almış nörotrofik faktörün (brain-derived neurotrophic factor) (BDNF), rodent foliküllerinde eksprese edildiğine ve foliküler gelişimi etkilemek için KISS1R ile etkileşime girdiğine dair kanıtlar vardır (Kerr ve ark. 2009, Zeydabadi Nejad ve ark. 2017). NTRK2'nin oosite özgü çıkarılması ile düzensiz foliküller oluşum ve farelerde oosit kaybı ile ilişkilendirilmiştir (Dorfman ve ark. 2014). Foliküler fonksiyon ve embriyo gelişiminde NTRK2 ve KISS1R arasındaki varsayılan etkileşim, embriyonun hayatta kalması, implantasyonu ve gebelik süreci ile ilişkili moleküler mekanizmalarda ortaya çıkan karmaşıklığın fazla olması sürecin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Şekil 12,13) (D'occhio ve ark. 2020).



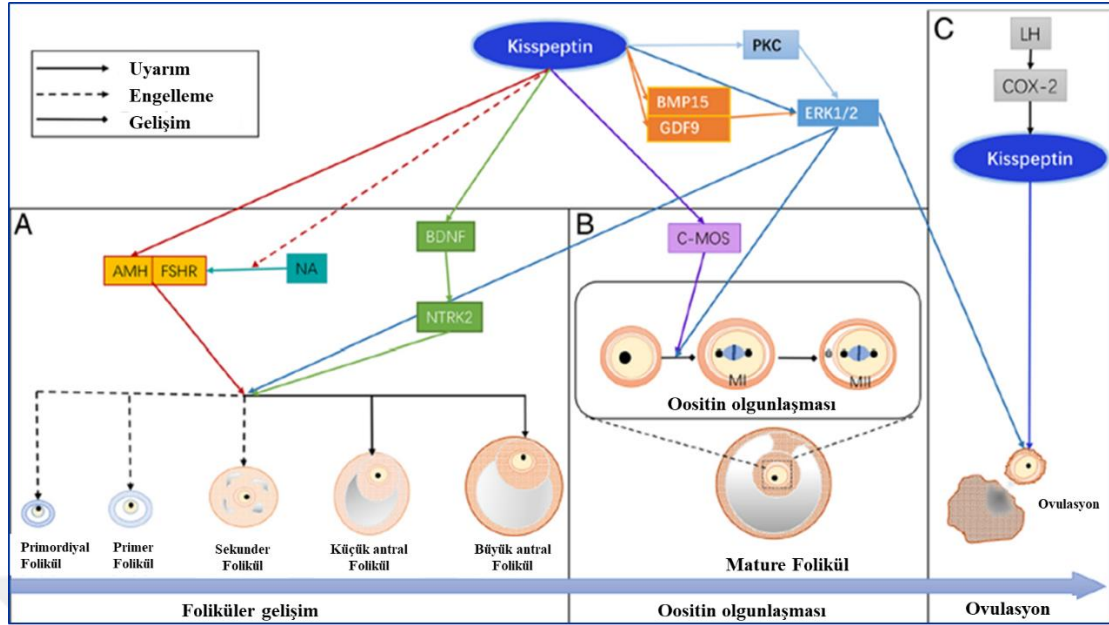
Şekil 12: Ovaryumlardaki foliküllerde ve korpus luteumda kisspeptinin (KISS1) varsayılan otokrin ve parakrin etkilerinin şematik gösterimi: KISS1 ve KISS1 reseptör (KISS1R) proteinleri granuloza

hücrelerinde, teka hücrelerinde, oositlerde ve korpus luteumda bulunur. Granuloza KISS1'in tekal hücreleri, oosit ve korpus luteumu etkilediği düşünülürken, teka KISS1'in oositi etkilediği düşünülmektedir. Oositler ayrıca KISS1R ile işbirliği içinde hareket ettiği görülen NTRK2 reseptörlerine sahiptir. LH yanıt olarak granuloza hücreleri, oositlerde reseptör NTRK2'yi uyaran BDNF üretir ve BDNF pubertas ile ilişkili bir mekanizma olabilir. Luteinize edici hormona (LH) yanıt olarak granuloza hücreleri, oositlerde reseptör NTRK2'yi uyaran BDNF üretir ve BDNF pubertas ile ilişkili bir mekanizma olabilir. NTRK2 içermeyen oositler, oositin hayatta kalması ve oosit gelişimsel yeterliliğinin kazanılması ve bir blastosist oluşturma yeteneği için gerekli olan PI3K / AKT'yi aktive etmek için gonadotropine yanıt vermezler. KISS1'in bu varsayılan etkileri geneli yansıtmayabilir ve tür farklılıkları olması muhtemeldir (Anderson 2014, Dorfman ve ark. 2014, Andrade ve ark. 2017).



Şekil 13: Kisspeptinin ovaryumdaki işlevi: Kisspeptin (KP) esas olarak ovaryumda granuloza hücrelerinde tespit edilir. Kisspeptin sinyali ile LH artışı, PI3K/AKT yolu yoluyla oositin hayatta kalmasını destekler. Ayrıca, Kisspeptin, Teka ve Granuloza hücreleri tarafından steroid hormonlarının salgılanmasını uyarır (Khan ve ark. 2022).

Yapılan çalışmalar ele alındığında bu veriler, kisspeptinin oosit olgunlaşması üzerindeki etkisinin mayoz bölünmenin düzenlenmesi yoluyla gerçekleştirilebileceğini düşündürmektedir (Şekil 14), (Cao ve ark. 2019).



Şekil 14: Kisspeptin/KISS1R sisteminin ovaryumdaki rolü. Ovaryum kaynaklı kisspeptin, foliküler gelişimi, oositin olgunlaşmasını ve ovulasyonu otokrin veya parakrin şekilde düzenler. **a** Foliküler gelişimde Kisspeptinin olası rolü ve mekanizmaları. **b** Kisspeptinin oosit maturasyonundaki olası rolü ve mekanizmaları. **c** Kisspeptinin ovulasyondaki rolü ve mekanizmaları. AMH, anti-Müllerian hormonu; BDNF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör; BMP15, kemik morfogenetik proteini 15; COX-2, Siklooksijenaz-2; FSH, folikül uyarıcı hormon; FSHR, folikül uyarıcı hormon reseptörü; GDF9, büyüme farklılaşma faktörü 9; LH, lüteinize edici hormon; NA, noradrenalin; NTRK2, nörotrofik tirozin kinaz reseptörü tip 2; PKC, protein kinaz C (Cao ve ark. 2019)

Cielesh ve ark. (2017) köpeklerin ovaryumunda östrus siklusunun farklı aşamalarında KISS1 ve KISSR lokalizasyonlarını araştırdıklarında, östrus siklusunun tüm aşamalarında (anöstrus hariç) oositlerde, granüloza hücrelerinde ve dioöstrus sırasında korpus luteumda (CL) KISS1 immünoreaktivite gösterdiğini bulgulamışlar. KISS1 pubertase ulaşmamış köpeklerin ovaryumlarında tespit edilememesine rağmen, siklusun her aşamasında KISS1R, oositlerde, primordial foliküllerde, granüloza hücrelerinde ve siklik köpeklerde CL'de immünoreaktivite göstermiştir. Granüloza hücrelerinde bulunan KISS1R, kisspeptin ve progesteronun bağlantılı olabileceğini düşünmektedirler, çünkü bu boyama modeli ile östrus sırasında foliküllerin preovulatar luteinizasyonu gösteren hayvanların ovaryumlarında görülür.

Ayrıca KISS1R pubertas öncesi ve anöstrus dönemindeki köpeklerin ovaryumunda da gözlenmiştir, Kisspeptinin oosit proliferasyonu, granüloza hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması ve progesteron üretiminde olası bir rolü

olduğunu düşünmektedirler. Bu çalışma, ovaryum içinde kisspeptin regülasyonu için bir köpek modelinin kurulması için bir başlangıç noktası sağlayacağı kanısındadırlar. Bu tanımlayıcı çalışma ile köpek ovaryumunda KISS1 ve KISS1R'ünün varlığını göstermektedir. KISS1 primordial foliküllerde, oositlerde, granüloza hücrelerinde ve CL'de gözlenmiş olsa da teka hücrelerinde gözlenmemiştir (Cielesh ve ark. 2017).

Ovaryumda kisspeptin ekspresyonunun başlamasının pubertasın önemli bir parçası olması ve potansiyel olarak ovaryum steroidogenezi ve/veya oogenezi süreçlerinde rol oynaması olasıdır. Bu nedenle ovaryumda kisspeptinini pozitif immünoreaktivite göstermesi pubertas öncesi köpeklerin pubertasa daha yakın olabileceği tahmin edilebilir. KISS1 anöstrus sırasında oositlerde ve KISS1R ekspresyonunun oositlerde ve siklustaki köpeklerde granüloza hücrelerinde de mevcut olduğu görülmüştür. Kisspeptinin, siklustaki köpeklerin granüloza hücrelerinde KISS1'in mevcut olması nedeniyle, Kisspeptin üreten granüloza hücrelerini uyarmasının mümkün olduğu düşünülmektedir (Cielesh ve ark. 2017).

Köpeklerde ovulasyon süreci hücrelerin luteinizasyonu, progesteronun salgılanması ve seviyesindeki bir artışla birlikte ovulasyondan önce başlar (Chastant-Maillard ve ark. 2011). Bu durum, granüloza hücrelerinde üretilen ve/veya bu hücrelerde etkili olan kisspeptinin köpeklerde de progesteron üretimi/salgılanması için önemli olma olasılığını artırmaktadır. Korpus luteumda hem KISS1 hem de KISS1R'nin varlığı bu hipotezi destekler, ancak bu etkileşimin büyük luteal hücrelere mi (granüloza kaynaklı) yoksa küçük luteal hücrelere mi (teka kaynaklı) ait olduğu açık olmamasına rağmen insan ovaryumunda her iki hücre tipinin progesteron ürettiği kanıtlanmıştır. Bu çalışma ile Kisspeptinin köpek ovaryumunda lokal bir rolü olduğunu düşünülmektedir. KISS1R, siklusun tüm aşamalarında oositlerde, granüloza hücrelerinde ve CL'de bulunur. Oositlerdeki KISS1, granüloza hücrelerinde KISS1 ekspresyonunu uyaran granüloza hücrelerinde KISS1R üzerinde etki ederek, granüloza hücrelerinin büyümesinin ve progesteron üretiminin artmasına neden olmaktadır (Cielesh ve ark. 2017).

Hayvan modelleri ve erken translayonel klinik araştırmalar sayesinde Kisspeptinin üreme aktivitelerine etkisinin keşfinden bu yana önemli bulgular sağlanmıştır. Yapılan birçok çalışma eşliğinde KISS1/KISSR sistemi HPG ekseninin

fizyolojisi ve patolojisinde yer aldığı söylenebilir. Kisspeptin ve reseptörleri, memeli ovaryumundan eksprese edilmiştir. Ayrıca, KISS1/KISS1R beyin içinde GnRH ve gonadotropin üretimini pozitif ve negatif feedback mekanizması yoluyla modüle etmek için çalışarak pubertal gelişme ile sonuçlanır ve bu sistem, foliküler gelişim, oosit olgunlaşması, steroidogenez ve ovulasyonu içeren dişi üreme sistemini düzenler. Kisspeptinin ovaryumdaki varsayılan rolü, oosit olgunlaşmasını, foliküler gelişimi ve ovulasyonu otokrin ve parakrin tarzda doğrudan kontrol eder. Kisspeptin ve reseptörünün bu temel işlevleri, merkezi üreme eksenini korumak için gereklidir (Khan ve ark. 2022).

1.5.5. Kisspeptinin İmplantasyon-Gebelik Sürecindeki Rolü ve Hücresel Etkisi

Kispeptin embriyonun taşınmasından, implantasyona ve gebeliğin oluşmasına yol açan fizyolojik olayların başlaması için temel unsurlar arasındadır (D'occhio ve ark. 2020). KISS1 ve KISS1R ekspresyonunun kadınlarda plasentasyonun erken dönemlerinde en yüksek seviyede olduğu görülmüş ve bu durum KISS1'in erken trofoblast implantasyonuna dahil olduğu önerisine yol açmıştır (Janneau ve ark. 2002). Ayrıca, KISS1 ekspresyonunun villöz trofoblast dokusunda lokalize olduğu, KISS1R ekspresyonunun hem villöz trofoblast hem de ekstrasvillöz trofoblastta meydana geldiği gösterilmiştir (Janneau ve ark. 2002, Bilban ve ark. 2004).

Erken gebelik sırasında plasentadan alınan trofoblastik hücre kaynaklı mRNA sinyalleri, orta dönem gebelikten alınan sinyallerle karşılaştırıldığında çok yüksek konsantrasyonda kisspeptin ve GPR54 reseptörünün olduğunu göstermiştir. KISS1 ve GPR54, stromal hücreleri desidualizasyon için hazırlar ve kisspeptinin insan üreme sisteminde parakrin sinyalleşmesinden sorumlu olduğunu kanıtlamıştır (Wu ve ark. 2019). Trofoblasttan türetilen KISS1'in erken implantasyon sırasında hem otokrin hem de parakrin etkilere sahip olabileceğini düşündürmüştür (HuChang ve ark. 2019). Ohtaki ve ark. (2001) KISS1 üzerine yapmış oldukları çalışmada, KISS1'in hücreler arası adezyon molekülleri ve hücre dışı matris proteinleri ile etkileşim yoluyla trofoblast implantasyonunu etkilediği öne sürülmüştür. KISS1'in implantasyon sırasındaki işlevsel rolü, erken plasentasyonun sıralı ve kontrollü bir süreçte olmasını sağlamaya yardımcı olan sinsitiyotrofoblast hücre invazyonunu ve anjiyogenez oranını

düzenlemektir (Bilban ve ark. 2004, Hiden ve ark. 2007, Francis ve ark. 2014). Bu nedenle KISS1, hem erken gebelikte hem de tümör metastazında hücre göçünün baskılanmasında benzer bir role sahiptir (Hiden ve ark. 2007).

Kisspeptin hücre göçünün önleyebilir ve hücre hareketliliğini ve/veya implantasyonunu değiştirebilir; bu süreç embriyonun implantasyon sürecindeki gebelik başarısı için çok önemli bir aşamayı oluşturduğu için önemlidir (Radovick ve Babwah 2019). Nidasyon, hücre dışı uterus matrisinin trofoblast tarafından penetrasyonuna bağlıdır. Kisspeptin ve diğer proinflatuar sitokinler, özellikle tümör nekroz faktörü (TNF) alfa, trofoblast saldırganlığını sınırlar ve doğum sırasında apoptozu aktive etmede anahtar rol oynar (Fayazi ve ark. 2015, Schäfer-Somi ve ark. 2017). Köpeklerde de trofoblast ve uterus arasındaki etkileşimde KISS10 ve GPR54'ün rol oynadığı önerilmiştir (Schäfer-Somi ve ark. 2017).

KISS1'in periferik reproduktif dokulardaki (ovaryum, trofoblast, uterus) etkisi, embriyonun hayatta kalması, implantasyonu ve bir gebeliğin oluşması ile ilişkili hücresel ve moleküler süreçlerin önemli bir bileşeni olarak ortaya çıkmıştır. Gebelik sürecinde, embriyonun tutunma ve implantasyonu embriyolar için kritik bir zaman olması ve bu süreçteki başarısızlıklar embriyo kaybına neden olmaktadır. Kisspeptinler üzerine yapılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen, implantasyon sırasında embriyonik trofoblastın uterus endometriyal epitel ile etkileşimi ile ilişkili mekanizmalar hakkında keşfedilecek birçok şey vardır (D'occhio ve ark. 2019, Sponchiado ve ark. 2019, D'occhio ve ark. 2020).

Literatür özetinden anlaşılabacağı üzere; dişi köpeklerde uzun etkili GnRH agonistlerinin pubertanın ertelenmesi amacıyla kullanımı, etki süresi ve flare-up güncel bir araştırma konusudur ve klinik ve histopatolojik yönden ovaryum/uterus fonksiyonları üzerine etkilerini araştıran az sayıda bilimsel çalışma mevcuttur. Köpeklerde, şimdiye kadar üreme dokularında sadece bir GnRH izoformu (GnRH-I) ve bir reseptör tipi tanımlanmıştır ve köpek uterus ve plasentadaki alanlarındaki ekspresyonları son zamanlarda ortaya konulmuştur (Schäfer-Somi ve ark. 2015). Kaya ve ark. (2017) köpeklerde yapmış olduğu çalışmada GnRH-R'nin luteal varlığı, GnRH'nın köpek korpus luteumu içinde olası doğrudan endokrin düzenleyici olarak katılımını düşündürmektedir.

Köpeklerin ve insanların üreme patolojilerinin ortak yönleri incelendiğinde, bu iki türdeki üreme olaylarının yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu yakın ilişkinin pubertal süreç için de geçerli olduğuna dair bulgular ve karşılaştırmalı araştırmalar rapor edilmektedir. Bu nedenle, köpeklerde pubertal süreç ve üreme sürecinin daha iyi anlaşılması insan üreme araştırmaları için değerli bilgiler sağlayabilir.

Pubertasın uzun süreli baskılanmasında kullanılan GnRH analogu deslorelinin, köpeklerde sonraki üreme aktivitesi ve ovaryumun işlevselliği üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığı görülmektedir. Ancak pubertanın GnRH agonistleri ile uyarılması ve olası yan etkileri üzerine araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında geç prepubertal dönemde GnRH agonisti kullanılarak pubertaya girişi uyarılan köpekler ile klinik olarak östrus bulgusu göstermeyenlerde ovaryum ve uterus GnRH/R ve KISS1/R ekspresyonunun düzeylerinin belirlenmesi ile köpeklerde östrusların yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik alternatif medikal kontrasepsiyon uygulamalarının moleküler düzeyde yönlendirilmesi için veri elde edilmesi planlanmıştır.

Bu hipotez doğrultusunda dişi köpeklerde deslorelinin geç pre-pubertal dönemdeki uygulamalarının klinik yanıtlarından yola çıkarak moleküler yanıtlarının da farklılık göstereceği ve bu moleküler yanıtta kisspeptinin rolünün önemli olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile dişi köpeklerde östrusların yönetimi ve kontrolünde geleceğe yönelik önemli bir alternatif olan Deslorelinin implantın geç pre-pubertal dönemde uygulaması sonrası genital dokulardaki GnRH/R ve KISS1/R ekspresyonu ve lokalizasyonları incelenmiş, GnRH agonisti uygulamaları ile pubertanın engellenmesi/ertelenmesi konularında ileri araştırmalar için tür düzeyinde katkı sunulması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Hayvan Materyali

Sunulan çalışmada Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesine sahipleri tarafından ovaryohisterektomi operasyonu (OHE) talebi ile getirilen, farklı ırklardan, klinik olarak sağlıklı, prepubertal dönemde olduğu anamnez ve klinik/laboratuvar bulgularıyla teyit edilen ortalama 8 aylık (7.79 ± 0.17) yaşta, toplam 25 adet dişi köpeğe ait ovaryum ve uterus dokuları kullanıldı. Operasyon öncesi hayvan sahipleri araştırma konusunda bilgilendirilerek onayları alındı.

Çalışmanın klinik bölümüne ait etik kurul kararı, Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından; KAÜ-HAYDEK/2018-033 sayı numarası ile onaylanmıştır. Sunulan çalışma söz konusu araştırmadaki hayvanlara ait doku materyali üzerinden yürütülmüş ve hayvan kullanım ve mevzuatı açısından 25.10.2022 tarih ve 2022/166 sayı numarası ile uygun bulunmuş ve tüm klinik uygulamalar etik kurul ilkeleri çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. Çalışma Grupları

Çalışmada kullanılan hayvan materyali aşağıdaki şekilde gruplandırıldı ve her grupta belirtilen sürelerde 4,7 mg deslorelin asetat (Suprelorin®, Virbac, Fransa) içeren implant interskapular bölgeye subkutan olarak uygulandı (Şekil 15). Implant uygulamasının ardından günlük klinik gözlemler ve iki günlük aralıklarla örneklemeler gerçekleştirildi. Gözlem süresinin sonunda tüm köpeklerden kan örnekleri alınarak OHE operasyonları gerçekleştirildi ve doku örnekleri prosedüre uygun olarak saklandı. Çalışma grupları ve yapılan uygulamalar aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2);

Tablo 2: Çalışma grupları ve yapılan uygulamalar.

Gruplar	İmplant	OHE Günü
ÖST (n=6)	Deslorelin implant	32-40
N-ÖST (n=10)		
KONT (n=9)	Plasebo 1 ml NaCL solüsyonu	30

ÖST: Östrus, N-ÖST: Non-östrus, KONT: Kontrol

**Şekil 15:** Deslorelin implantın interskapular bölgeye uygulanması (a-d).

2.2.1.1 Kan Örneklerinin Alınması ve Hormon Analizleri

Tüm köpeklerden tekniğine uygun olarak Vena cephalica antebrachii'den antikoagülsüz serum tüplerine alınan kan örnekleri 3500 devirde 10 dk. boyunca santrifüj edildikten sonra serum ve plazma örnekleri ayrıldı. Alınan örnekler -20°C'de hormon ölçümleri gerçekleştirilinceye kadar saklandı. Östradiol (E2, pg/ml) ve Progesteron (P4, ng/ml) konsantrasyonları Siemens (Siemens®, Tarrytown, New York, ABD) marka tam otomatik hormon analiz cihazı ve ADVIA Centaur test analiz kitleri ile doğrudan Kemilüminesans (CLIA) yöntemi kullanılarak ölçüldü. ADVIA Centaur testi sensitivitesi %100 ve spesifitesi %95,5 olan bir ölçüm tekniğidir.

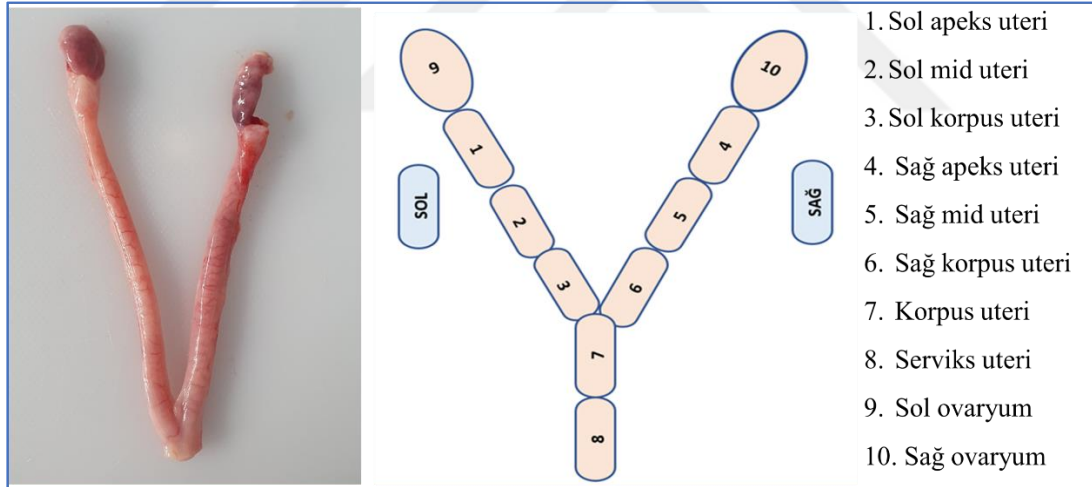
2.2.1.2. Ovaryohistektomi Operasyonlarının Yapılması ve Dokuların Alınması

Ovaryohistektomi operasyonu genel anestezi altında yapıldı. Anestezinin indüksiyonunu desteklemek amacıyla anestezi öncesi atropin sülfat (Atropin®, 2 mg / ml konsantrasyon; Vetaş, Türkiye) 0,05 mg / kg, SC dozda uygulandı. Premedikasyon ksilazin HCl (Rompun® 23,32 mg / ml; Bayer, Türkiye) ile 2,35 mg / kg dozda IM uygulandı. Sedasyon sağlandıktan 15 dakika sonra ketamin HCl (Ketasol®, 100 mg / ml; İnterhas, Türkiye) ile 10 mg / kg IM dozda uygulandı. Anestezi daha sonra IV

ketamin HCl enjeksiyonu ile sürdürüldü. Tüm hayvanlara OHE sonrası profilaktik antibiyotik (sefazolin sodyum; 30 mg/kg/gün, IM, İespor® 500 mg flakon; I.E. Ulugay, Türkiye) ve analjezik (meloksikam; 0,2 mg/kg, SC, Maxicam® 5 mg/ml; Sanovel, Türkiye) tedavi uygulandı.

2.2.1.3. Alınan Dokuların İşlenmesi

Çalışmada kullanılmak üzere alınan dokular anatomik yapısına göre bölümlendirildikten sonra (Şekil 16) Real Time qPCR analizlerinde kullanılacak dokular taze olarak sıvı azotta donduruldu ve -80 °C’de saklandı. Ovaryum ve uterus dokularının diğer bölümü ise immunohistokimyasal analizlerde kullanılmak üzere belirlenen fikzasyon protokolüne uygun olarak sırasıyla; %4 paraformoldahit solüsyonunda +4 °C’de 24 saat bekledikten sonra, 7 gün boyunca fosfat bufer saline (PBS) ile yıkandı. Ardından sırasıyla %30, %50 ve %70 etanol absolüt solüsyonunda dehidrasyon işlemi yapıldı ve ardından standart immünohistokimyasal analiz protokolü uygulanarak parafin bloklar haline getirildi.



Şekil 16: Dokuların anatomik yapısına göre bölümlendirilmesi.

2.2.2. Real Time qPCR için Dokuların Hazırlanması

Aşağıda belirtilen adımlar sırasıyla izlenerek -80 °C’de muhafaza edilen uterus ve ovaryum dokuları Real Time qPCR işlemi için hazır hale getirildi.

2.2.2.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonunda -80°C 'de saklanan dokularda sırasıyla aşağıda açıklanan RNA izolasyon işlemleri uygulandı. RNA'ların denatüre olmamaları için yapılan bütün uygulamalar soğuk zincirde gerçekleştirildi.

Dokular -80°C 'den sıvı azot içerisine alınan dokular mekanik olarak daha küçük parçalara ayrıldı (Şekil 17a). Ardından içerisi buz dolu bir strafor içerisine yerleştirilen steril bir havan içerisinde sıvı azot eşliğinde iyice ezilerek çok küçük parçalar haline getirildi (Şekil 17b-d)



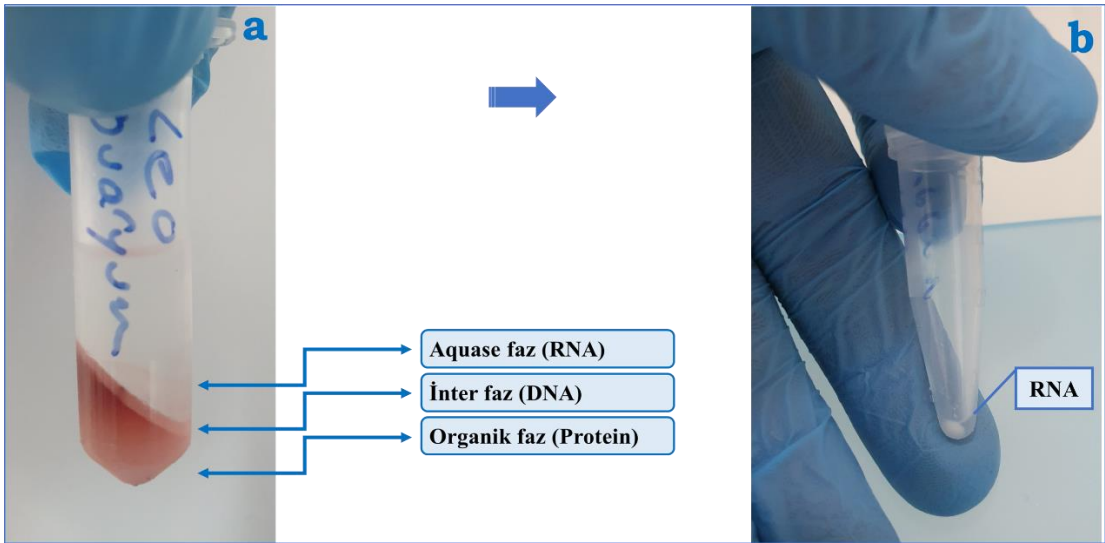
Şekil 17: Dokuların total RNA izolasyonu için hazırlanması

Havan içerisinde küçük parçalar haline getirilen dokular, 1ml Trizol (TRIzol®-reaktif, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) eklenen ependorfa alındı. Buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika bekletildikten sonra ependorfa alınan doku örneği buz dolu bir beher içerisine yerleştirilerek homojenizatörde (6.500-21.500 devir/dk) homojenize edildi. Dokular arasında RNA kontaminasyonunu önlemek için homojenizatörün bıçağı her bir dokunun ardından sırasıyla steril %10 NAOH (0,1N), %70 etanol ve steril bidistile su ile temizlendi (Şekil 18).



Şekil 18: Dokulara Trizol eklenmesi (a), homojenizatörden geçirilmesi (b) ve kloroform eklenen dokuların santrifüj edilmesi (c)

Lize olan dokular 10 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra, üzerine 200 μ l kloroform eklendi ve ikinci 10 dakika bekletmenin ardından 140.000 G de +4°C de 10 dakika santrifüj edildi. Sonrasında, örnekler -20°C'den alınarak 10.000 devir/dk. de +4°C de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atılıp, pelet üzerine 500 μ l %70'lik etanol eklendi ve 10 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra tekrar 10.000 devir/dk. de +4°C de 10 dakika santrifüj edildi ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Ardından, elde edilen 3 fazdan en üste bulunan renksiz kısım tekrar yeni bir ependorfa alınıp üzerine sulu (aquase) faz miktarı kadar (ortalama 500 μ l) isopropanol eklendi ve 30 dakika boyunca -20°C de bekletildi (Şekil 19).



Şekil 19: Doku fazları (a) ve RNA peletinin çıkarılması (b).

Daha sonra RNA peletinden etanolü tamamen uzaklaştırmak için multi-spin işlemi yapıldı ve RNAlardan etanol tamamen buharlaşana kadar örnekler oda ısısında muhafaza edildi. Elde edilen RNA örnekleri kuruyunca, RNA parçalayıcı enzim olmayan (RNase free ve DEPC bulunan) steril bidistile su pelet üzerine bire bir oranda (ortalama 10-20µl) eklenerek çözüldü.

Son olarak elde edilen RNA örnekleri termo-surface cihazında 10 dk. 50°C kaldıktan sonra RNA konsantrasyonlarının spektrofotometrik ölçüm (260-280 nm absorbans ölçüm aralığı) ile belirlenmesi ve cDNA sentezi çalışmalarında kullanılmak üzere -80 °C de saklandı.

2.2.2.2. RNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Total RNA ekstraksiyon işleminden elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi spektrofotometrik ölçüm cihazı (Thermo NanoDrop™ 2000c) kullanılarak gerçekleştirildi. Cihaza 2 µl distile su (ddH₂O) eklenerek körleme (blank) işlemi yapıldı. Blank işleminin ardından örneklerden sırasıyla 2 µl alınıp RNA konsantrasyon ölçme işlemi tamamlandı. RNA'ların konsantrasyonları 260-280 nm absorbans ölçümleri ile belirlendi (şekil 20). DNA için yaklaşık 1,8 oranı genellikle “saf” olarak kabul edilirken, RNA için bu oran yaklaşık 2,0’ dır. Çalışmanın sonraki basamaklarında kullanılmak üzere konsantrasyonlar 1000ng (cDNA reaksiyon başına 1000 ng (örneğin 20 µl cDNA hacminde 1000 reaksiyon) değerine sabitlendi. Yapılan bu işlem PCR aşamasında tutarsız sonuçların önüne geçilebilmesi için önem arz etmektedir.



Şekil 20: Spektrofotometrik ölçümler ile RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi.

2.2.2.3. Reverse Transkripsiyon ile cDNA Sentezi

Dokuların RNA konsantrasyonları 1000 ng olacak şekilde ayarlandı. Oligo (dT) ve Random Hexamer primerleri ile Revers Transkriptaz işlemi yapıldı. cDNA sentezinde Reverse Transkriptaz enzimi (Sensifit (Bioline) cDNA Kit) kullanıldı. Söz konusu kitlerin primer tasarımları exon-exon junctions olarak yapılmıştır. Herhangi bir DNA kontaminasyonu durumunda primerler DNA'ya bağlanmamaktadır. Bu nedenle kontaminasyonu engellemek için DNase treatment işleminde gerek kalmamıştır.

Buz üzerinde steril tüp içerisinde aşağıdaki bileşenler hazırlanarak, kısa bir vorteks ve multi-spin yapıldı (Tablo 3). Reverse Transkripsiyon ile cDNA sentezinde ABI Veriti 96 (Applied Biosystems. Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler) cihazı kullanıldı. Cihazın Revers Transkripsiyon işlem basamaklarında sırasıyla: 25 °C 10 dk primer bağlaması, 42 °C 15 dk reverse transkripsiyon işlemi ve 85 °C 5 dk enzim inaktivasyonunu uygulandı. Reaksiyon sonunda enzim 85 °C'de 5 dk 'da inaktive edilerek, cDNA ürünleri -20 °C'de PCR analizlerinde kullanılmak üzere muhafaza edildi (Şekil 21).

Tablo 3: Reverse Transkripsiyon ile cDNA bileşenlerinde komponent hacimleri.

cDNA Bileşenlerinde Komponent Hacimleri	
Komponentler	Miktar
cDNA Buffer 5X	2 µl
RT Enzim (Sensifast (Bioline) cDNA Kit)	0.5 µl
Total RNA	RNA miktarı + ddH ₂ O = 7.5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O (ddH ₂ O)	
Toplam Hacim	10 µl

**Şekil 21:** Reverse Transkripsiyon ile cDNA sentezi aşamaları.

2.2.2.4. Real Time qPCR hazırlık işlemleri ve mRNA Gen Ekspresyon Analizleri

Liyofize (kurutulmuş) yapıda 50 nmol HPLC olarak gelen primerler Biomars protokollerine uygun olarak Nuclease free water ile sulandırıldı. PCR analizlerinde kullanılacak primerler 0,4 µM PCR konsantrasyona sabitlendi.

Yapılan PCR analizlerinde GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R olmak üzere 4 hedef genin ekspresyon düzeylerine bakıldı (şekil 22). İnternal kontrol olarak ise üç farklı referans gen (EIF4H, KDM4A, PTK2) kullanıldı. İlgili genlerin mRNA transkript seviyeleri SensiFAST™ SYBR® RT-qPCR Kit (Sigma SensiFAST SYBR

No-ROX Kit (Meridian Bioscience)) kullanılarak tespit edildi. Her bir gen için primer dizaynı Primer-3 (Primer Express Software ver. 3.0, Applied Biosystems by Thermo Fischer) kullanılarak yapıldı. Sentez işlemleri Biomers (Ulm, Almanya) firmasında gerçekleştirildi (Tablo 4).



Şekil 22: Hedef (a) ve housekeeping gen primerleri (b).

Tablo 4: Kullanılan genlerin oligonükleotit dizileri ve genbank referans numaraları.

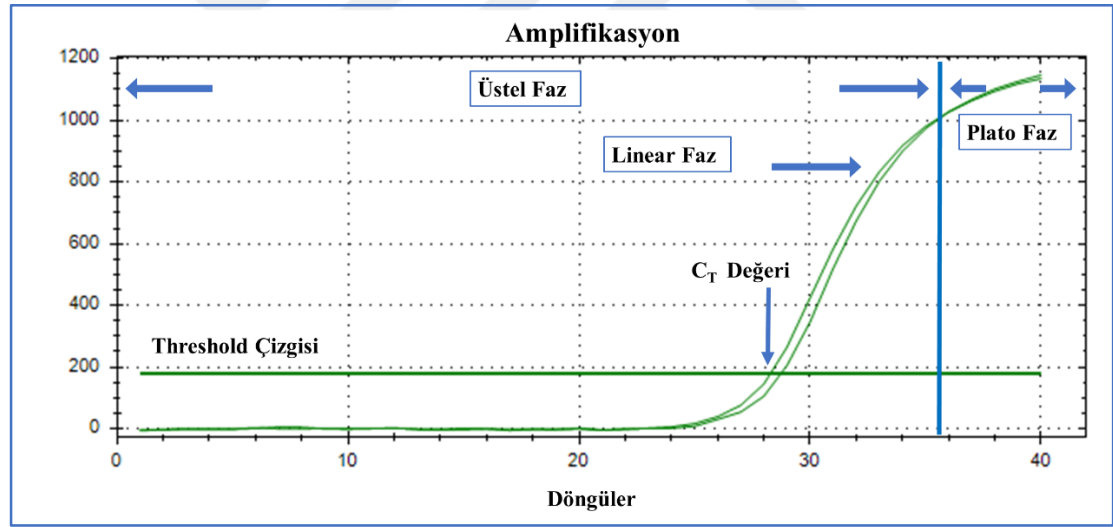
Oligonükleotit Dizileri		
Oligo Adı	5'-Gen Primer Dizileri -3'	Gen ID Canis lupus familiaris (dog)
For: GnRH1	5'-AGTCTGATTGAAGAGGAA-3'	XM_038434631
Rev: GnRH1	5'-AATATGTGAACTTAGCGTAA-3'	
For: GnRH-R	5'-ACACGAGTCCTTCATCAG-3'	AF206513
Rev: GnRH-R	5'-AGTCCAGCACACAGTAAA-3'	
For: KISS1	5'-CCTGGTTTCTTGGCAGCTAATG-3'	KJ512885
Rev: KISS1	5'-GTCTCCATGGGTGCCACCTT-3'	
For: KISS-R	5'-GGAACCTCTCTGGTCCTTT-3'	NM_001314087
Rev: KISS-R	5'-TTGGCTATGTAAAAGTTGGT-3'	
For: EIF4H	5'-TAAGGTCTCAGCAATTAC-3'	Cf02713640_m1
Rev: EIF4H	5'-AAGTTAAGTATTGGTGTCA-3'	
For: KDM4A	5'-TCACAGAGAAGGAAGTTAAG-3'	Cf02708629_m1
Rev: KDM4A	5'-GCAGGCTCAATGTAATCT-3'	
For: PTK2	5'-ACCTGGCTGACTTCAATC-3'	Cf02684608_m1
Rev: PTK2	5'-ATCTTCAACTGTAGCATTCCCT-3'	

PCR analizlerinde kullanılacak bileşenler toplam hacim 10 µl olacak şekilde: 5 µl Master mix (SensiFAST SYBR® No-ROX Mix (Meridian Bioscience)), 2,5 µl mRNA MixB (Primer) 2,5 µl cDNA örneğinden oluştu. NTC (negative kontrol) 2,5 µl steril distile su (numune yerine) ile oluşturuldu. Bileşenler (komponentler) soğuk blok üzerinde aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 5).

Tablo 5: SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit mRNA gen ekspresyon bileşenleri.

Bileşenler	Derişim	Miktar 1X
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	2x Mastermix (1,5) buffer	5 µl
mRNA MixB (Primer)	F & R	2,5 µl
mRNA cDNA	1.000 ng	2,5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	-	2,5 µl

Son aşamada mRNA dizileriyle oluşturulan cDNA zincirleri, rölatif ekspresyon analizlerinde kullanıldı. Doku ve kontrol gruplarında bulunan numunelerin her biri için, ilgili mRNA ve ona uygun referans genine ait dizilerin real time PCR cihazı ile çoğaltılması sağlandı. 40 döngü üzerinden yapılan çalışmalarda floresan değerinin eşik değerini geçtiği (Threshold çizgisini kestiği) noktadan alınan eşik değeri (C_t, C_p, C_q) hesaplamalarda kullanıldı (Şekil 23).

**Şekil 23:** Amplifikasyon eğrisinin oluşumu.

Çalışmada yapılan tüm RT-qPCR analizleri, 96 kuyucuklu platelerde ve duplike olarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon koşulları ise gen optimizasyonlarına göre gerçekleştirildi (Tablo 6). PCR ürünlerine ait pikler incelenerek sonuçlar değerlendirildi (Şekil 24).

Tablo 6: RT-qPCR analizleri yapılan genlerin amplifikasyon koşulları

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Süre		Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C- 2 dk.		1
PCR Amplifikasyon	Denatürasyon	95°C-10 sn.		40
	Bağlanma	PTK2	63°C	
		KDM4A	64 °C	
		EIF4H	61 °C	
		GNRH1	61°C	
		GNRH-R	57 °C	
		KISS1	65°C	
		KISS1-R	59 °C	
Melting Curve Analizi	Denatürasyon	95°C- 10 sn.		1
		70°C- 5 sn. (Okuma)		1
		95°C- 5 sn. (Okuma)		1

**Şekil 24:** Bio-RAD (CFX®96 Real Time system) PCR cihazı (a) gen ekspresyon işlemleri (b-c).

İlgili her bir genin mRNA ekspresyon seviyeleri, Bio-RAD (CFX®96 Real Time system) protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Yapılan işlem sonunda cihazdan alınan hedef genler (GnRH/R, KISS1/R) ile referans genler (EIF4H, KDM4A, PTK2) karşılaştırmalı CT ($\Delta\Delta CT$ yöntemi veya Livak yöntemi: hedef genin CT değerini endojen referans genin sonucuyla karşılaştırmak için bir aritmetik formül kullanılarak hesaplanır) $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ metodu ile değerlendirildi (Tablo 7).

Tablo 7: Gen ekspresyon metodu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ Livak Metot).

Gen Ekspresyon Metodu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ Livak Metot)		
Grup	Hedef Gen	Referans Gen
Çalışma Grubu	A	A*
Kontrol Grubu	B	B*

$$2^{-[(\Delta Ct (A) - (\Delta Ct (A^*)) - ((\Delta Ct (B) - (\Delta Ct (B^*)))]$$

*: Gen ekspresyon çalışmasında standardizasyon için kullanılan referans gen sonucu

2.2.2.5. Analiz Sonuçlarının Hesaplanmasında Kullanılan Parametreler

Ct (Cp-Cq): Real time PCR cihazlarında amplikasyon döngüleri sırasında alınan floresan ışımaya ait threshold çizgisi üzerinde bulunan eşik değeri.

dCt (ΔCt): Hedef genin ortalaması (duplike çalışıldığı için) - housekeeping 3 genin geometrik ortalaması (Ekspresyon seviyesini belirlemek istediğimiz genin Ct değeri ile normalizatör genin Ct değerinin farkı).

ddCt ($\Delta\Delta Ct$): Hedef genin dCt (ΔCt) değeri – Çalışma Kontrol grubunun (n:9) ortalama dCt (ΔCt) değeri (Ekspresyon seviyesi hesaplanmak istenilen genin gruplar arasındaki farkı).

2^{-ddCt} ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): Ekspresyon seviyesi belirlenmek istenilen genin gruplar arasındaki katsayı (**fold change; FC**) değeri, gen ekspresyon çalışmalarında katsayı değişimi verileri kullanılmaktadır.

Fold Change (FC: Katsayı değeri): Kat sayı değişimi Hedef gen kontrol grubuna göre ekspresyon seviyeleri artmış veya azalmış.

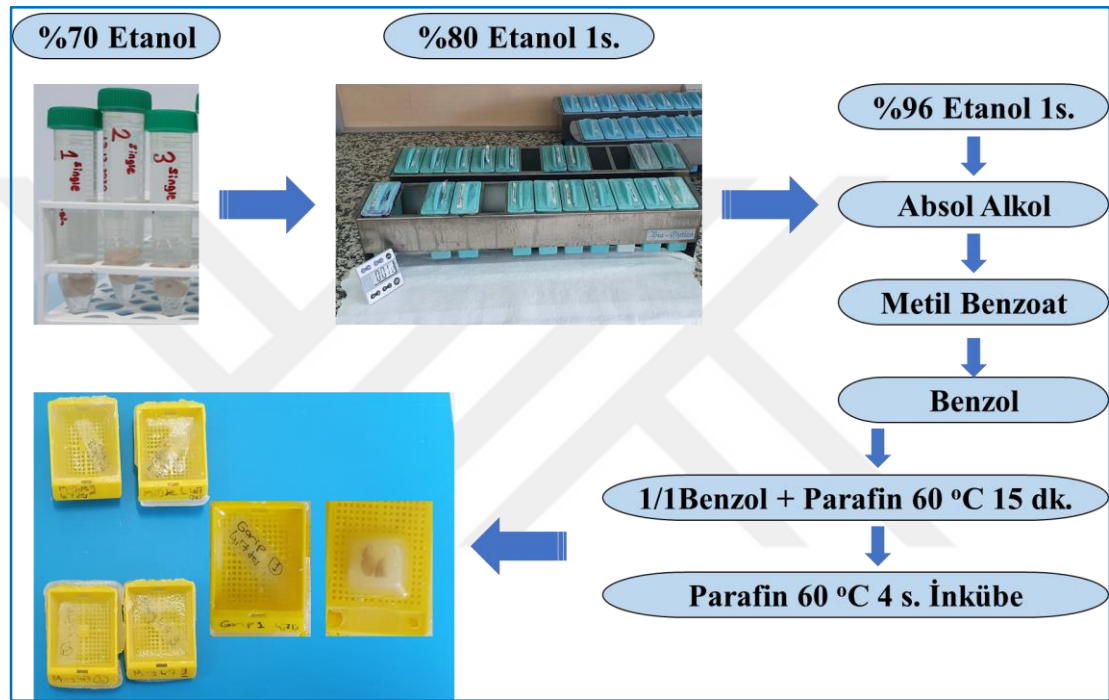
Katsayı değişimi (FC) 1'in üzerinde ise ekspresyon seviyeleri artmış

Katsayı değişimi (FC) 1'in altında ise ekspresyon seviyeleri azalmış

Scala değeri: Standart ekspresyon değeri 0,1-1,1 arasındaki değerler.

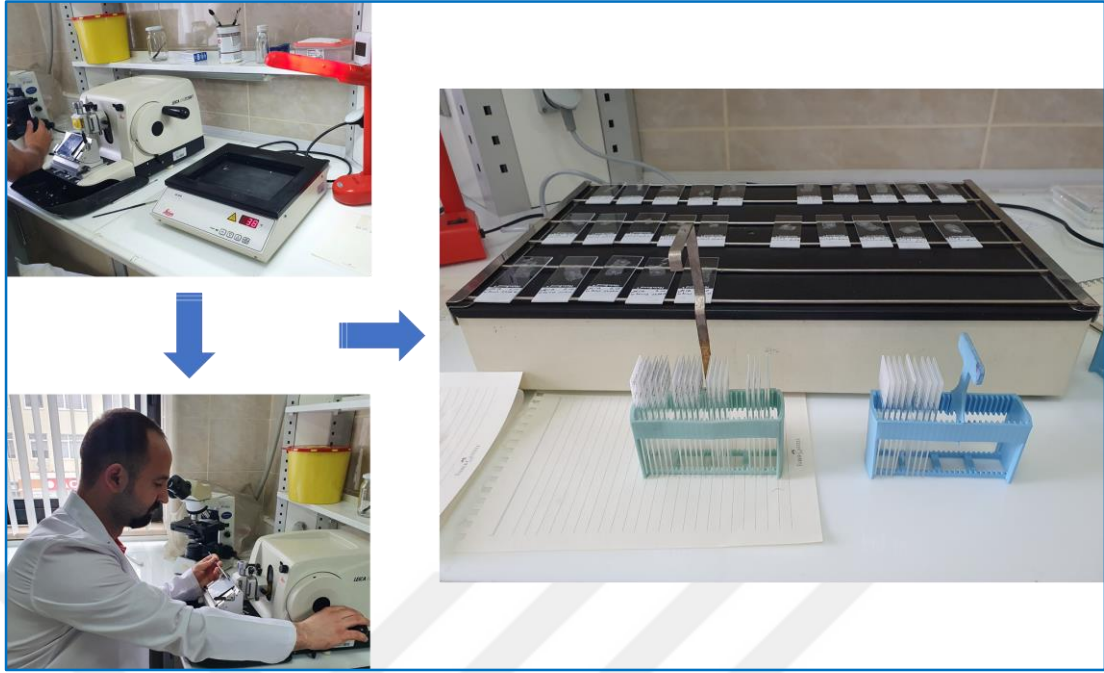
2.2.3. İmmünohistokimyasal Analiz [Streptavidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) İmmunoperoksidaz Tekniği]

Dehidrasyon işlemine tabi tutulan dokular immünohistokimyasal analizlerde kullanılmak üzere parafin kasetlerine sığacak boyutlarda hazırlanarak %70 etanolde bekletildi. Ardından standart immünohistokimyasal analiz protokol uygulanarak parafin bloklar haline getirildi (Şekil 25).



Şekil 25: Parafin blokların hazırlanması.

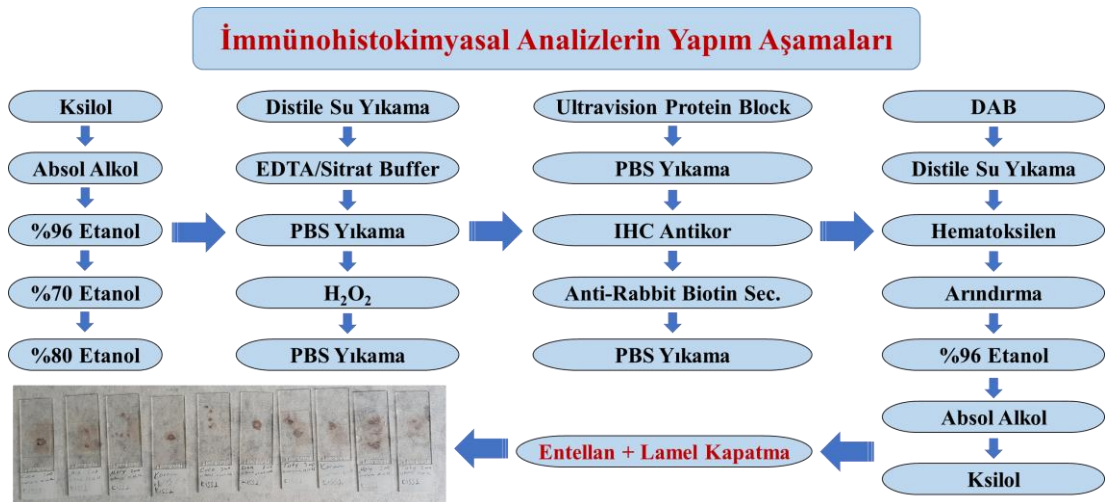
Ovaryum ve uterus dokularında GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R'lerinin immünlokalizasyonunu belirlemek amacıyla parafin bloklar haline getirilen dokulardan mikrotom cihazı (Leika Rm 2125Rt) ile 2 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler su banyosunda özel lamalar (Marienfeld Histobond+ Adhesive pozitif yüklü mikroskop lamı ref: 0810401) üzerine alınıp preparatlar hazırlanarak 37 °C'de etüvde 24 saat bekletildi (Şekil 26).



Şekil 26: Parafin bloklardan kesitleri alınan dokuların İmmünohistokimyasal analizler için hazırlanması.

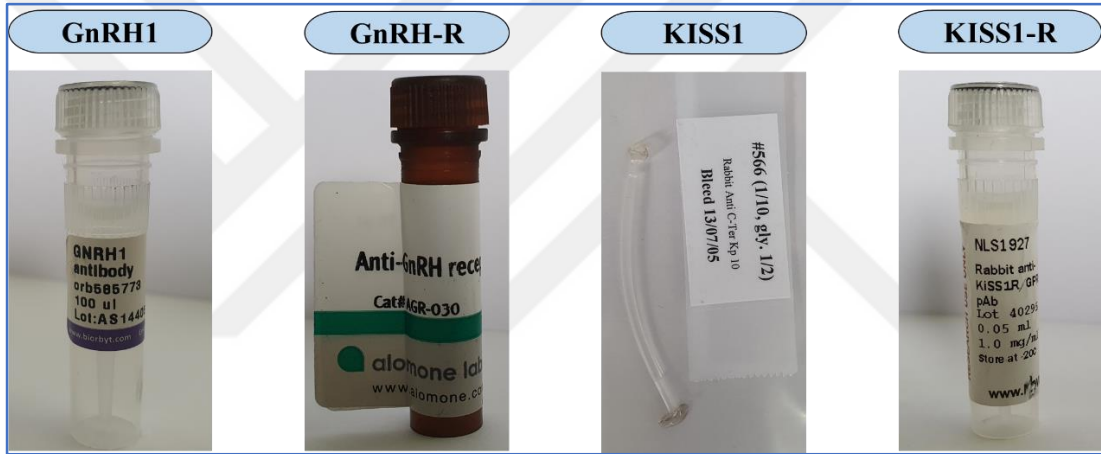
2.2.3.1. İmmünohistokimyasal (IHC) Analizlerin Yapılması

İmmünohistokimyasal analizler için hazırlanan preparatlara sırasıyla deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri yapıldı. Söz konusu işlemlerin aşamalarına ait ayrıntılar şekil 27’de verilmiştir.



Şekil 27: İmmünohistokimyasal analizlerin aşamaları.

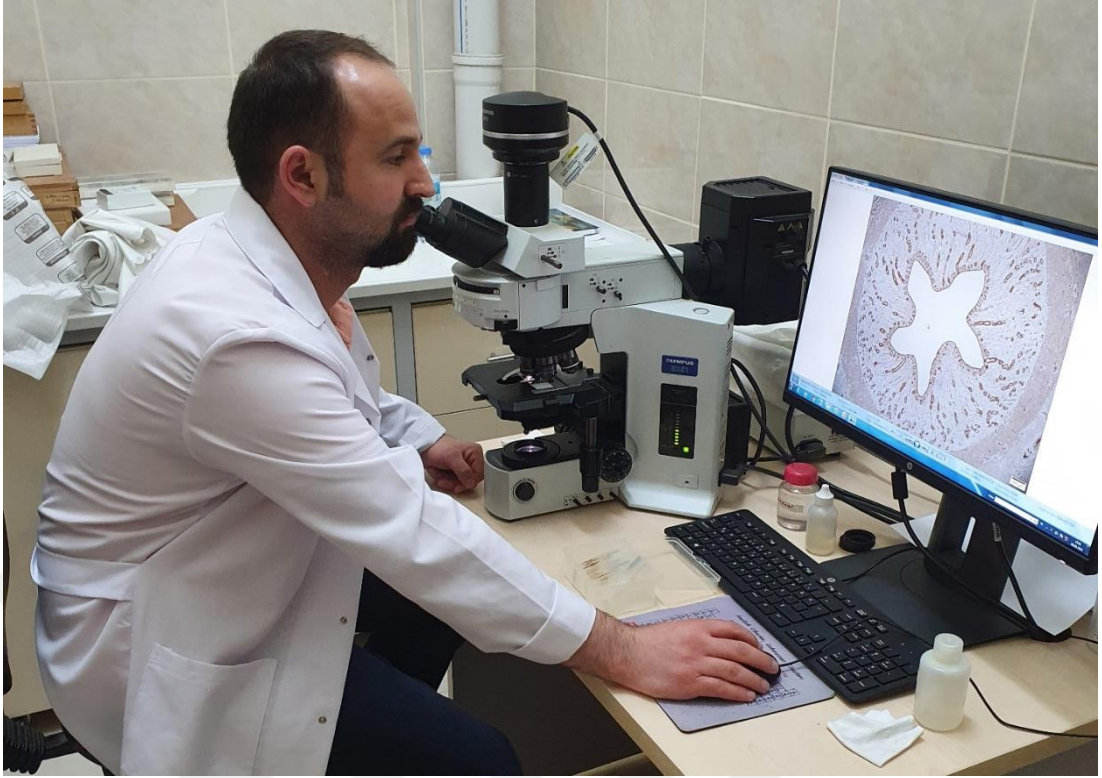
IHC analizlerde antikor olarak; Rabbit polyclonal antibody GnRH1 (Biorbyt orb585773), Rabbit polyclonal antibody GnRH-R (Alomone Labs USA Lot: AGR030), Rabbit polyclonal antibody KISS1 (Prof. Dr. Alain Caraty'den temin edildi, INRA, France) ve Rabbit polyclonal antibody KISS-1R/GPR54 (Novus NLS1927) kullanıldı (Şekil 28). Kullanılacak antikorlar 1/100 oranında hazırlandı: Ultra Anti Body Diluent Plus 100 µl + 10 µl Antikor eklendi. Ultra Anti Body Diluent Plus (Thermo Antibody Diluent OP Quanta TA-125-ADQ Lot: ADQ160912). Negatif kontrol (izotip kontrol) olarak dokulara, ilgili antikorlara karşı, antikor yerine aynı türden bağışık olmayan IgG'lerle veya birincil antiserumla aynı seyreltme ve protein konsantrasyonunda hazırlanarak inkübe edildi.



Şekil 28: İmmünohistokimyasal analizlerde kullanılan antikorlar.

Hazırlanmış olan preparatlardaki immün boyanmalar ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi ve sonuçlar tablo şeklinde dokulardaki boyanan hücrelerin lokalizasyonlarına göre sunuldu (Şekil 29). Dokularda kahverengi presipitasyonun görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Buna göre; ışık mikroskopunda yüksek büyütmede (bar: 20µm-X40) hücrelerde immunoreaktivite gözlenmemesi (-) reaksiyon, sadece yüksek büyütmede (bar: 20µm-X40) hücrelerde immunoreaktivite gözlenmesi zayıf reaksiyon (+/-), düşük büyütmede (bar: 50/100µm- X10/X20) hücrelerde immunoreaktivitenin net gözlemi güçlü reaksiyon (+), düşük büyütmede (bar: 50/100µm- X10/X20) hücrelerde immunoreaktivitenin yoğun gözlemi çok güçlü reaksiyon (++) olarak değerlendirildi.



Şekil 29: Dokuların ışık mikroskopunda değerlendirilmesi.

2.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla IBM SPSS 22 (SPSS®, IL, USA) paket programı kullanıldı. RT-qPCR analizleri ile elde edilen hedef ve kontrol genlerinin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasıyla elde edilen veriler grup ortalamalarına karşı test edildi.

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SEM) şeklinde özetlenmiştir. Steroid hormon bulgularının istatistiksel değerlendirmesinde değerlerin normal dağılım sağlayıp sağlamadığı Shapiro-Wilk analizi ile belirlendi. Serum E2 değerlerinde normal dağılım sağlandığından tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA), serum P4 konsantrasyonunun kıyaslanmasında grupların normal dağılım sağlamamasından dolayı Kruskal-Wallis ANOVA kullanıldı. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde grup analizlerinin normal dağılımı sağlamasından dolayı kıyaslamalar için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve bağımsız iki örnek t testi (Independent Samples t-test) kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için

Post-Hoc çoklu karşılaştırma testi Tukey uygulandı. İstatistiksel analizlerde $p < 0,05$ olasılık değeri önemli olarak kabul edildi.

Logaritmik Transformasyon: Cihaz kayıtları sonrasında normalizasyon işlemi (Livak Metot) gerçekleştirilen verilerin aşırı düşük veya yüksek ifadeli gen ekspresyon katsayıları vermeleri istatistik analizlerde veri dağılımlarını etkilemektedir. Sunulan çalışmada normalize edilmiş nispi gen ekspresyon seviyelerinin logaritmik transformasyonları gerçekleştirilerek aşırı ve düşük ifadeli gen ekspresyon seviyelerine eşit ağırlık atfederek veri dağılımları daha simetrik hale getirilmiştir. Böylelikle aykırı değerlerin etkisi büyük ölçüde ortadan kaldırılmıştır.



3. BULGULAR

Sunulan tez çalışmasında geç prepubertal dönemde Deslorelin implant uygulanan 16 köpekten 6'sı östrus grubunu (ÖST), 10'u non-östrus grubunu (N-ÖST) ve rutin ovaryohisterektomi operasyonu talebi ile kliniğimize getirilen ve geç pre-pubertal dönemde olduğu belirlenen 9 köpekten alınan dokular kontrol grubunu (KONT) oluşturdu.

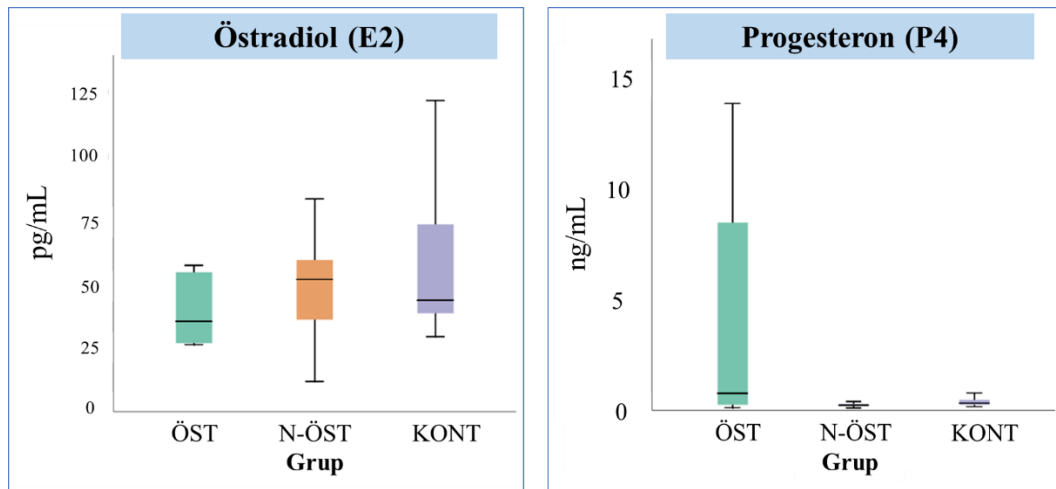
3.1 Serum Östradiol ve Progesteron Değerleri

Ovaryohisterektomi günü operasyon öncesi alınan serum örneklerinden yapılan ölçümlerde grupların ortalama serum östrojen konsantrasyonu değerleri ve karşılaştırmalı sonuçlar tablo 8 ve şekil 30'de ayrıntılı olarak verilmiştir Serum steroid hormon değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 8: Grupların ortalama serum östradiol (E2) ve progesteron (P4) konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

Parametre	Grupların ortalama serum östradiol ve progesteron konsantrasyonu $\pm$ SEM			İstatistik
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)	P
E2 (pg/mL)	39.1 $\pm$ 5.88	47.2 $\pm$ 7.15	59.1 $\pm$ 10.4	,303
(min-max)	(26.1 / 57.0)	(11.8 / 82.9)	(29.2 / 121.0)	
P4 (pg/mL)	4.01 $\pm$ 2.35	0.26 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.07	,117
(min - max)	(0.11 / 13.8)	(0.10 / 0.39)	(0.16 / 0.77)	

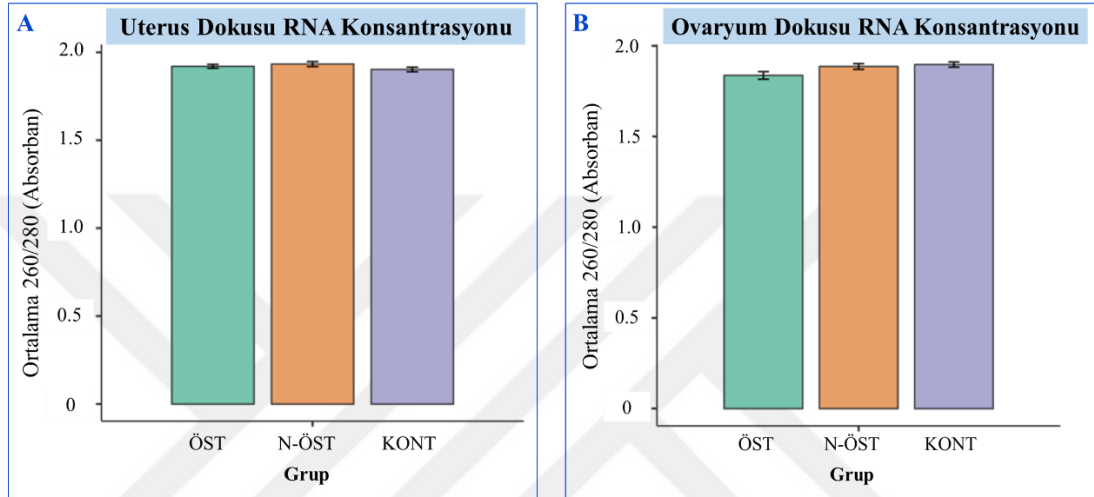
ÖST: Östrus, N-ÖST: Non-östrus, KONT: Kontrol



Şekil 30: Grupların ortalama serum E2 ve P4 konsantrasyonları.

3.2 Dokuların RNA Konsantrasyonu

Total RNA ekstraksiyon işleminden elde edilen RNA'ların konsantrasyonları grupların uterus ve ovaryum dokularına göre ortalama değerleri ile gruplardaki köpeklerin bireysel değerleri belirlendi. RNA'ların miktarı 260-280 nm absorbans ölçümleri ile 0 en düşük 2 en yüksek aralık olacak şekilde 0-2 aralığında değerlendirildiğinde yüksek konsantrasyonda RNA elde edildi (Şekil 31).



Şekil 31: Grupların uterus (A) ve ovaryum (B) dokularından elde edilen RNA konsantrasyonları.

Çalışmada kullanılan uterus ve ovaryum dokularının gruplardaki ortalama RNA konsantrasyon değerleri aşağıda verilmiştir (Tablo 9). Buna göre RNA konsantrasyonu min-max değerlerinin gruplardan bağımsız olarak ovaryum dokularında 1,77 ile 1,94 aralığında, uterus dokularında ise 1,85 ile 1,98 aralığında olduğu belirlendi.

Tablo 9: Grupların uterus ve ovaryum dokularının RNA konsantrasyonları.

Doku	Uterus ve Ovaryum Dokularının RNA Konsantrasyonu		
	Ortalama (260/280 Abs*)		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Uterus	1.92 ± 0.011	1.93 ± 0.014	1.90 ± 0.013
(Min-max)	(1,87-1,94)	(1,85-1,98)	(1,85-1,96)
Ovaryum	1.84 ± 0.020	1.89 ± 0.015	1.90 ± 0.014
(Min-max)	(1,77-1,90)	(1,79-1,94)	(1,77-1,94)

ÖST: Östrus, N-ÖST: Non-östrus, KONT: Kontrol

3.3. Uterus Dokusunda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Ekspresyon Düzeylerinin Real Time PCR ile Yarı Kantitatif Değerlendirilmesi

Gruplardaki köpeklere ait uterus dokularının mRNA dizileriyle oluşturulan cDNA zincirleri, relativ ekspresyon analizlerinde kullanılarak, doku ve kontrol gruplarında bulunan numunelerin her biri için, ilgili mRNA ve ona uygun referans genine ait dizilerin real-time PCR sonuçları elde edildi. Farklı düzeylerde olmakla birlikte tüm hedef genlerin ekspresyonu, incelenen her bir gruba ait uterus dokularında saptanabildi (Tablo 10). Bununla birlikte N-ÖST grubunda 2 köpeğin (Mart, Gama) ve KONT grubunda 1 köpeğin (Fi) uterus dokusunda GnRH-R geni ekspresyonu belirlenebilme limitinin altında olduğundan tespit edilemedi.

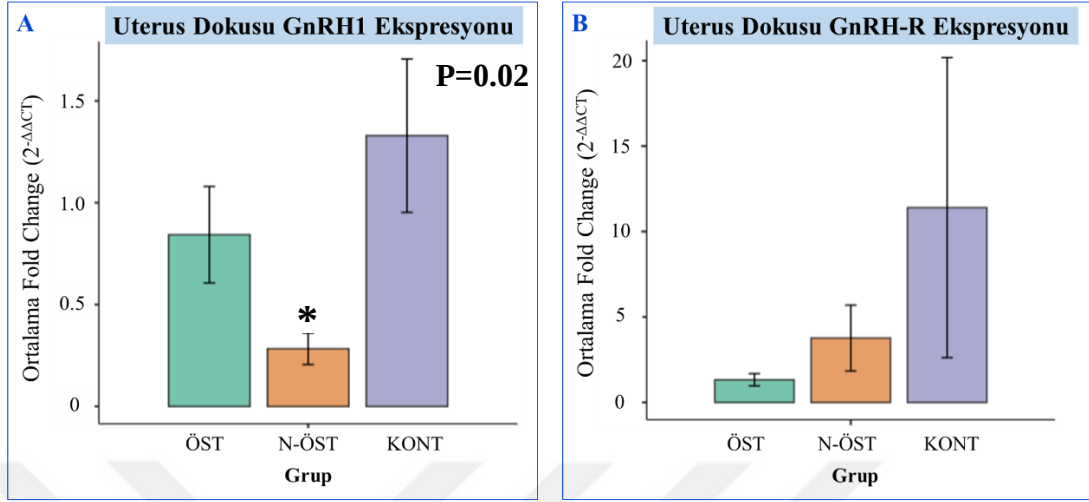
Tablo 10: Uterus dokusunda hedef genlerin gruplara göre ortalama FC $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

Genler	Uterus Dokusu			İstatistik
	Ortalama FC 2- ^{ΔΔCt} Değerleri ± SEM			
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)	P
GnRH1	0.84 ± 0.23 ^a	0.28 ± 0.07 ^b	1.33 ± 0.37 ^a	,002
GnRH-R	1.33 ± 0.35	3.77± 1.93	11.4 ± 8.78	,609
KISS1	2.07 ± 1.27	3.71 ± 1.67	2.04 ± 0.86	,501
KISS-R	3.05 ± 1.37	15.7 ± 10.5	5.88 ± 5.01	,288

ÖST: Östrus, N-ÖST: Non-östrus, KONT: Kontrol

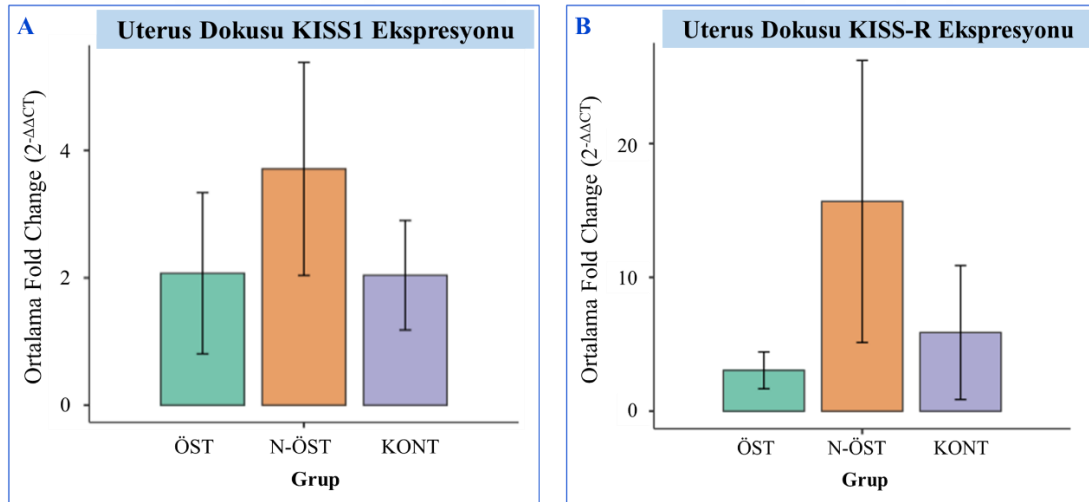
Elde edilen sonuçlara göre GnRH1 ekspresyonunun, kontrol grubundaki hayvanlara kıyasla implant yerleştirilen ÖST ve N-ÖST gruplarındaki uterus dokularında azaldığı, bu azalmanın N-ÖST grubunda diğer gruplara göre anlamlı ($p = 0,02$) olduğu belirlendi (Şekil 32-A).

GnRH-R'ünün uterus dokusundaki ekspresyonu değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı ($p > 0.05$). Bununla birlikte GnRH-R mRNA ekspresyon seviyesi KONT grubunda 11.4 ± 8.78 ile ÖST (1.33 ± 0.359) ve N-ÖST (3.77 ± 1.93) grubuna göre en yüksek düzeydeydi (Şekil 32-B).



Şekil 32: Uterus dokusunda GnRH1 (A) ve GnRH-R'ün (B) ekspresyonu.

Uterus dokusunda hem KISS1 hem de KISS-R ekspresyonu N-ÖST grubunda diğer gruplardan sayısal değer olarak daha yüksek olmakla birlikte gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi ($p>0.05$; Şekil 33-A). KISS-R ekspresyon düzeyi yönünden en düşük değer 3.05 ± 1.37 ile ÖST grubundaydı. (Şekil 33-B).



Şekil 33: Uterus dokusunda KISS1 (A) ve KISS-R (B) ekspresyonu.

3.4. Ovaryum Dokusunda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Ekspresyon Düzeylerinin Real Time PCR ile Yarı Kantitatif Değerlendirilmesi

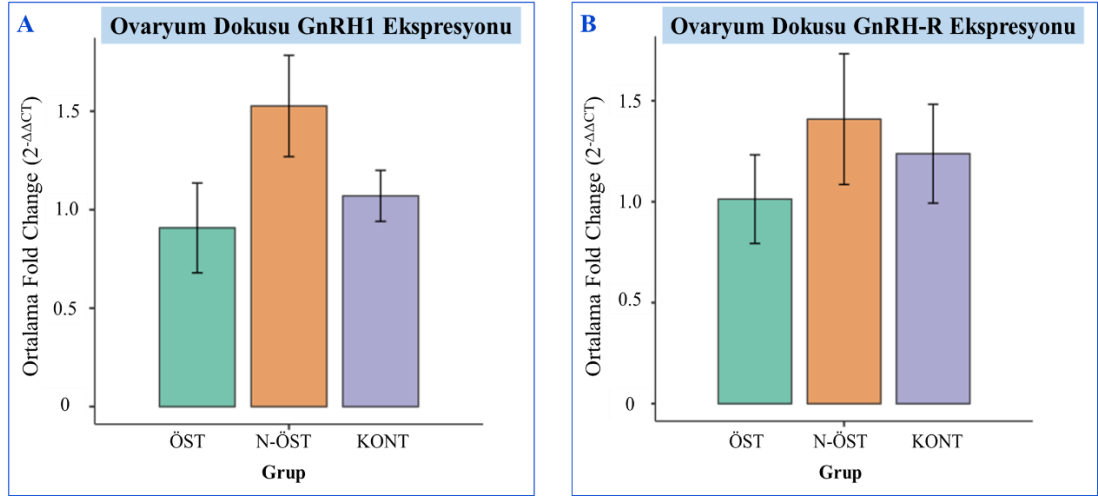
Gruplardaki köpekler için ait ovaryum dokularında farklı düzeylerde olmakla birlikte tüm hedef genlerin ekspresyonu saptanabildi. Elde edilen ortalama Fold Change katsayı değişim değerlerine ait bulgular implant uygulamasını takiben köpeklerin ovaryum dokularında KISS1 ve KISS-R ekspresyonunu anlamlı düzeyde değiştiğini gösterdi (Tablo 11).

Tablo 11: Ovaryum dokusunda hedef genlerin gruplara göre ortalama FC $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

Genler	Ovaryum Dokusu			İstatistik
	Ortalama FC $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri $\pm$ SEM			P
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)	
GnRH1	0.907 $\pm$ 0.228	1.53 $\pm$ 0.257	1.07 $\pm$ 0.130	,100
GnRH-R	1.01 $\pm$ 0.219	1.41 $\pm$ 0.324	1.24 $\pm$ 0.245	,765
KISS1	0.642 $\pm$ 0.130 ^a	1.07 $\pm$ 0.133 ^b	1.04 $\pm$ 0.097 ^b	,042
KISS-R	0.341 $\pm$ 0.024 ^a	0.500 $\pm$ 0.110 ^b	1.25 $\pm$ 0.327 ^b	,003

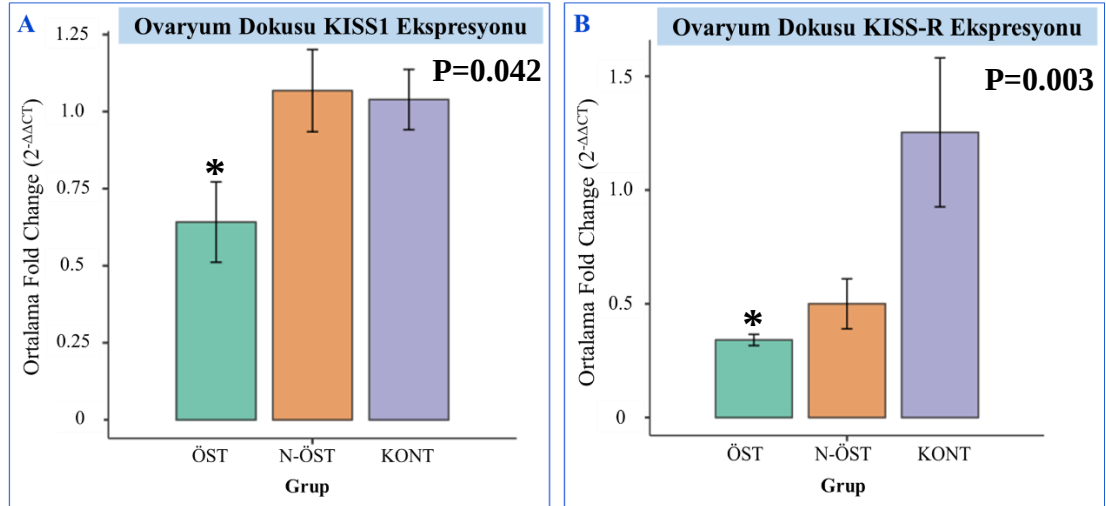
ÖST: Östrus, N-ÖST: Non-östrus, KONT: Kontrol

Hem GnRH1 hem de GnRH-R'nün ovaryum dokusundan elde edilen ortalama Fold Change katsayı değişim değerleri gruplara arasında benzer bulundu ($p>0.05$). Bununla birlikte hem GnRH1 hem de GnRH-R için N-ÖST grubunda diğer gruplardan daha yüksek düzeyde ekspresyon seviyesi belirlendi (Şekil 34-A ve B).



Şekil 34: Ovaryum dokusunda GnRH1 (A) ve GnRH-R'ün (B) ekspresyonu.

Hem KISS1'in hem de KISS-R'nün ovaryum dokusundan elde edilen ortalama Fold Change katsayı değişim değerlerine ait bulgular değerlendirildiğinde ÖST grubunun KISS1 ve KISS-R ekspresyon seviyelerinin diğer gruplardan anlamlı düzeyde daha düşük olduğu belirlendi ($p=0,042$ ve $p=0,003$). Grupların GnRH1 ekspresyon seviyelerine ait Fold Change katsayı değişim bulguları: (Tablo 11, Şekil 35 A ve B).



Şekil 35: Ovaryum dokusunda KISS1 (A) ve KISS-R (B) ekspresyonu.

Tüm gruplardaki uterus ve ovaryum dokularından ekspresyonu incelenen GnRH1, GnRH-R, KISS1, KISS-R genlerinin PCR sonuçlarının bireysel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Fold Change ve Logaritmik Transformasyon değişim katsayıları aşıağıda verilmiştir (Tablo 12, 13 ve 14).



Tablo 12: Östrus grubunun $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Fold Change ve logaritmik transformasyon değişim katsayıları.

Doku		Köpek Adı	Fold Change Değeri				Logaritmik Transformasyon Değişim Katsayısı			
			KISS1	GnRH1	KISS-R	GnRH-R	KISS1	GnRH1	KISS-R	GnRH-R
ÖST (n=6)	Ovaryum	Müjde	0,862	0,425	0,783	2,428	-0,213	-1,234	-0,352	1,28
		Karam	8,345	1,799	9,448	0,281	3,061	0,847	3,24	-1,83
		Lady	0,386	0,287	0,528	2,390	-1,373	-1,802	-0,922	1,257
		Paris	1,442	0,772	1,677	1,015	0,528	-0,374	0,746	0,022
		Beta	1,046	1,256	4,005	0,964	0,065	0,329	2,002	-0,052
		Ella	0,349	0,518	1,862	0,872	-1,519	-0,95	0,897	-0,198
	Uterus	Müjde	0,381	0,382	0,375	0,860	-1,393	-1,389	-1,417	-0,217
		Karam	0,829	1,381	0,424	1,488	-0,271	0,465	-1,238	0,573
		Lady	0,126	0,124	0,351	0,091	-2,984	-3,006	-1,511	-3,458
		Paris	0,967	0,973	0,348	0,824	-0,049	-0,039	-1,524	-0,278
		Beta	0,755	1,023	0,300	1,387	-0,405	0,032	-1,739	0,472
		Ella	0,791	1,561	0,249	1,426	-0,338	0,643	-2,004	0,512

Tablo 13: Non-Östrus grubunun $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Fold Change ve logaritmik transformasyon değişim katsayıları.

Doku		Köpek Adı	Fold Change				Logaritmik Transformasyon Değişim Katsayısı			
			KISS1	GnRH1	KISS-R	GnRH-R	KISS1	GnRH1	KISS-R	GnRH-R
N-ÖST (n=10)	Uterus	Garip	2,453	0,464	1,189	9,750	1,294	-1,107	0,249	3,285
		Sister	18,132	0,246	108,755	14,761	4,18	-2,024	6,765	3,884
		Mary	0,313	0,371	0,480	1,587	-1,675	-1,429	-1,059	0,666
		Mart	4,076	0,040	11,132	-*	2,027	-4,657	3,477	-*
		Nisan	0,625	0,061	0,809	0,182	-0,678	-4,026	-0,305	-2,454
		Alfa	1,542	0,122	18,081	0,898	0,625	-3,03	4,176	-0,155
		Gama	3,516	0,023	13,017	-*	1,814	-5,432	3,702	-*
		Coco	1,538	0,221	1,062	0,199	0,621	-2,178	0,086	-2,331
		Bella	0,394	0,774	0,771	0,656	-1,344	-0,37	-0,375	-0,609
		Alice	4,511	0,509	1,424	2,094	2,173	-0,975	0,51	1,066
	Ovaryum	Garip	0,747	1,544	0,232	1,255	-0,42	0,627	-2,107	0,328
		Sister	1,628	1,243	0,377	0,178	0,703	0,313	-1,407	-2,489
		Mary	0,874	1,081	0,869	2,052	-0,194	0,113	-0,203	1,037
		Mart	1,392	1,407	0,673	1,087	0,477	0,492	-0,571	0,12
		Nisan	1,806	2,532	1,275	3,684	0,853	1,34	0,35	1,881
		Alfa	0,842	1,179	0,349	1,963	-0,249	0,237	-1,52	0,973
		Gama	1,031	1,271	0,481	0,354	0,045	0,346	-1,056	-1,497
		Coco	0,419	3,375	0,304	0,763	-1,256	1,755	-1,716	-0,39
		Bella	0,922	0,686	0,300	0,951	-0,117	-0,544	-1,739	-0,073
		Alice	1,019	0,946	0,138	1,802	0,027	-0,08	-2,857	0,849

*: Ekspresyonu belirlenebilme limitinin altında.

Tablo 14: Kontrol grubunun $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Fold Change ve logaritmik transformasyon değışim katsayıları.

Doku		Köpek Adı	Fold Change				Logaritmik Transformasyon Değişim Katsayısı			
			KISS1	GnRH1	KISS-R	GnRH-R	KISS1	GnRH1	KISS-R	GnRH-R
KONT (n=9)	Uterus	Zilli	0,278	1,293	0,286	11,989	-1,848	0,37	-1,807	3,584
		Süpriz	0,912	1,095	1,231	1,030	-0,133	0,13	0,3	0,043
		Lucy	0,664	0,976	0,475	0,105	-0,591	-0,035	-1,074	-3,249
		Bacı	5,839	1,160	45,859	71,974	2,546	0,214	5,519	6,169
		Berlin	1,135	2,224	1,120	0,215	0,183	1,153	0,164	-2,218
		Tuty	1,910	0,497	0,271	0,022	0,934	-1,008	-1,882	-5,484
		Fi	7,082	3,925	2,852	-*	2,824	1,973	1,512	-*
		Leo	0,183	0,508	0,481	5,440	-2,452	-0,978	-1,056	2,444
		Mia	0,363	0,283	0,313	0,409	-1,462	-1,82	-1,676	-1,29
		Zilli	1,155	0,725	0,402	1,272	0,208	-0,463	-1,316	0,347
	Ovaryum	Süpriz	1,287	1,183	3,555	0,344	0,364	0,243	1,83	-1,541
		Lucy	1,254	0,486	1,230	0,272	0,326	-1,042	0,298	-1,877
		Bacı	0,974	1,217	1,265	0,731	-0,038	0,283	0,339	-0,453
		Berlin	0,558	0,636	0,600	2,436	-0,842	-0,654	-0,736	1,284
		Tuty	0,842	1,184	1,221	1,960	-0,248	0,243	0,288	0,971
		Fi	0,831	1,745	0,641	1,145	-0,266	0,804	-0,641	0,195
		Leo	1,525	1,283	0,518	1,150	0,609	0,36	-0,948	0,202
		Mia	0,924	1,171	1,849	1,830	-0,114	0,227	0,887	0,872

*: Ekspresyonu belirlenebilme limitinin altında.

3.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Uterus ve ovaryum dokularındaki immunoreaktivite yoğunluğu immünohistokimyasal kesitler ışık mikroskobu ile incelenerek, (-) ila (++) arasında değişen bir derecelendirme skalası ile dokulardaki lokalizasyonları tablolar halinde detaylı olarak açıklandı.

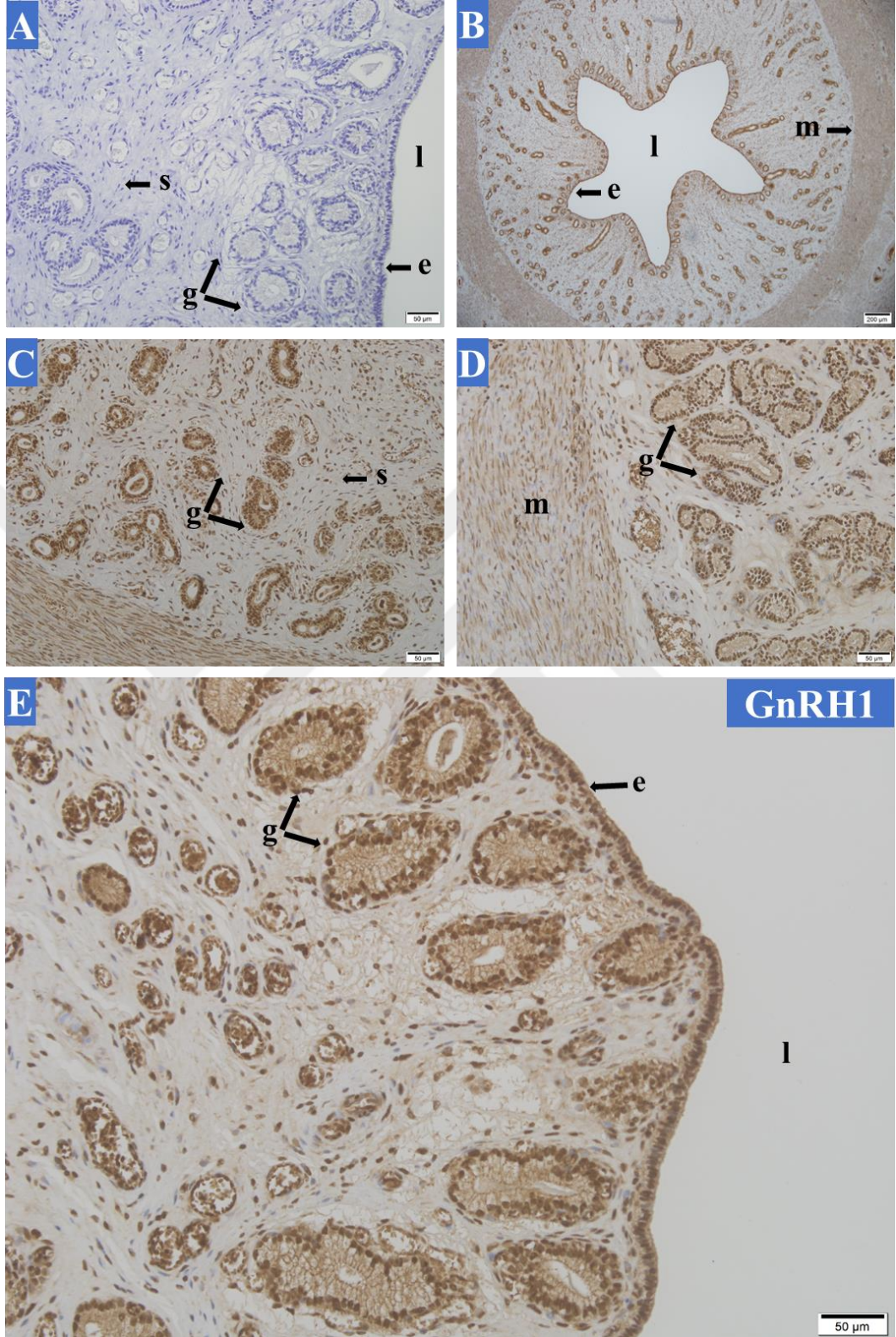
3.6. Uterus Dokusunda GnRH1 ve GnRH-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu

İmmünohistokimyasal kesitlerde GnRH1'in bütün gruplarda uterusun hücresel lokalizasyonlarında farklı derecede pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda uterusun endometriyal stroma dışındaki tüm katmanlarında güçlü reaksiyon belirlenirken myometriyumda daha zayıf reaksiyon görüldü (Tablo 15, Şekil 36, 37 ve 38).

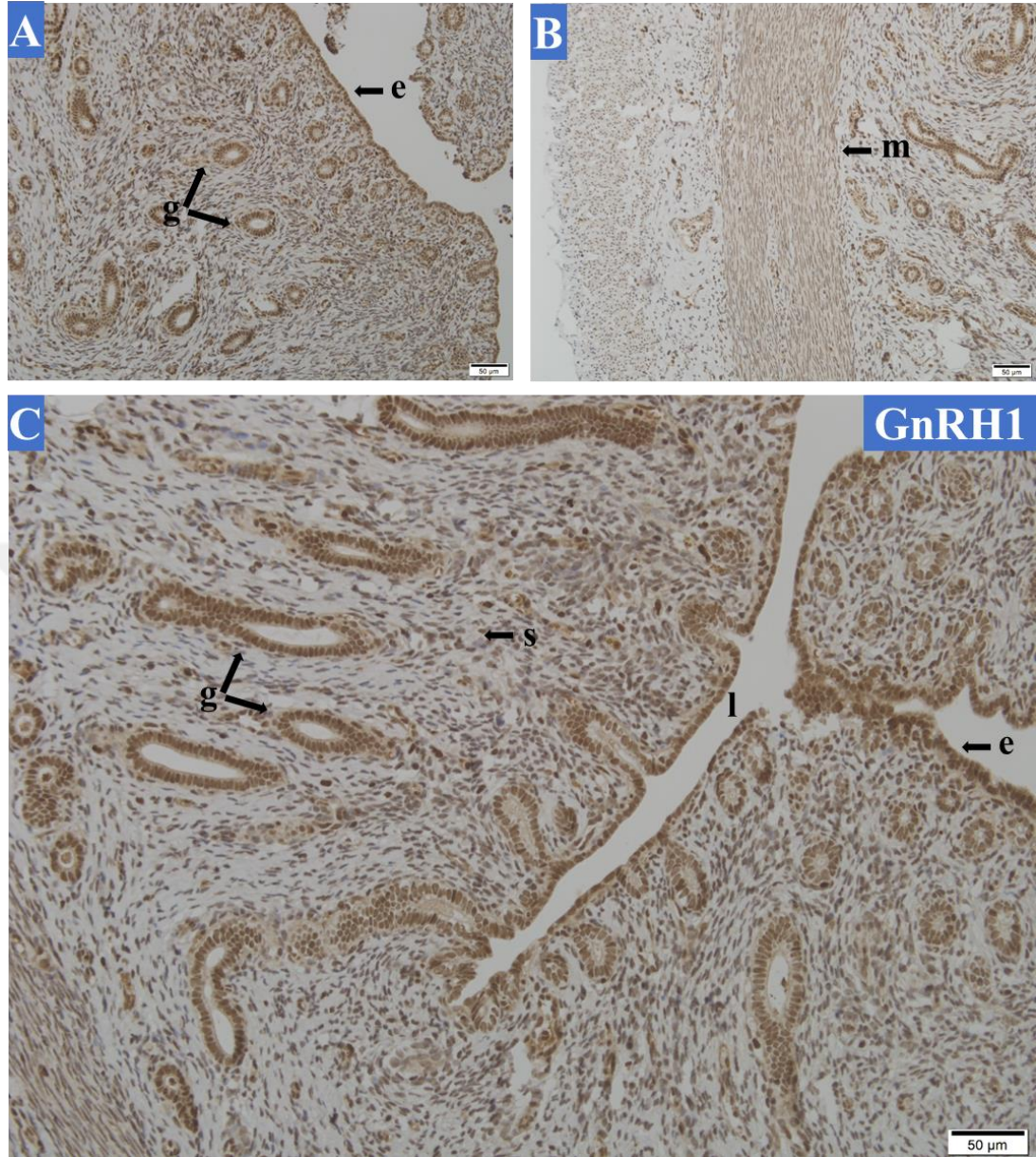
Tablo 15: Uterus dokusunda GnRH1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.

Uterus	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Endometriyum			
Lümen epitel hücreleri	++	++	++
Endometriyal bezler	++	++	++
Yüzeysel uterus bezleri	++	++	++
Derin uterus bezleri	++	++	++
Endometriyal stroma	+	+	+
Miyometriyum			
Miyositler	+	+	+
İnterstisyel hücreler	+	+	++
Miyometriyal stroma	+	+	+

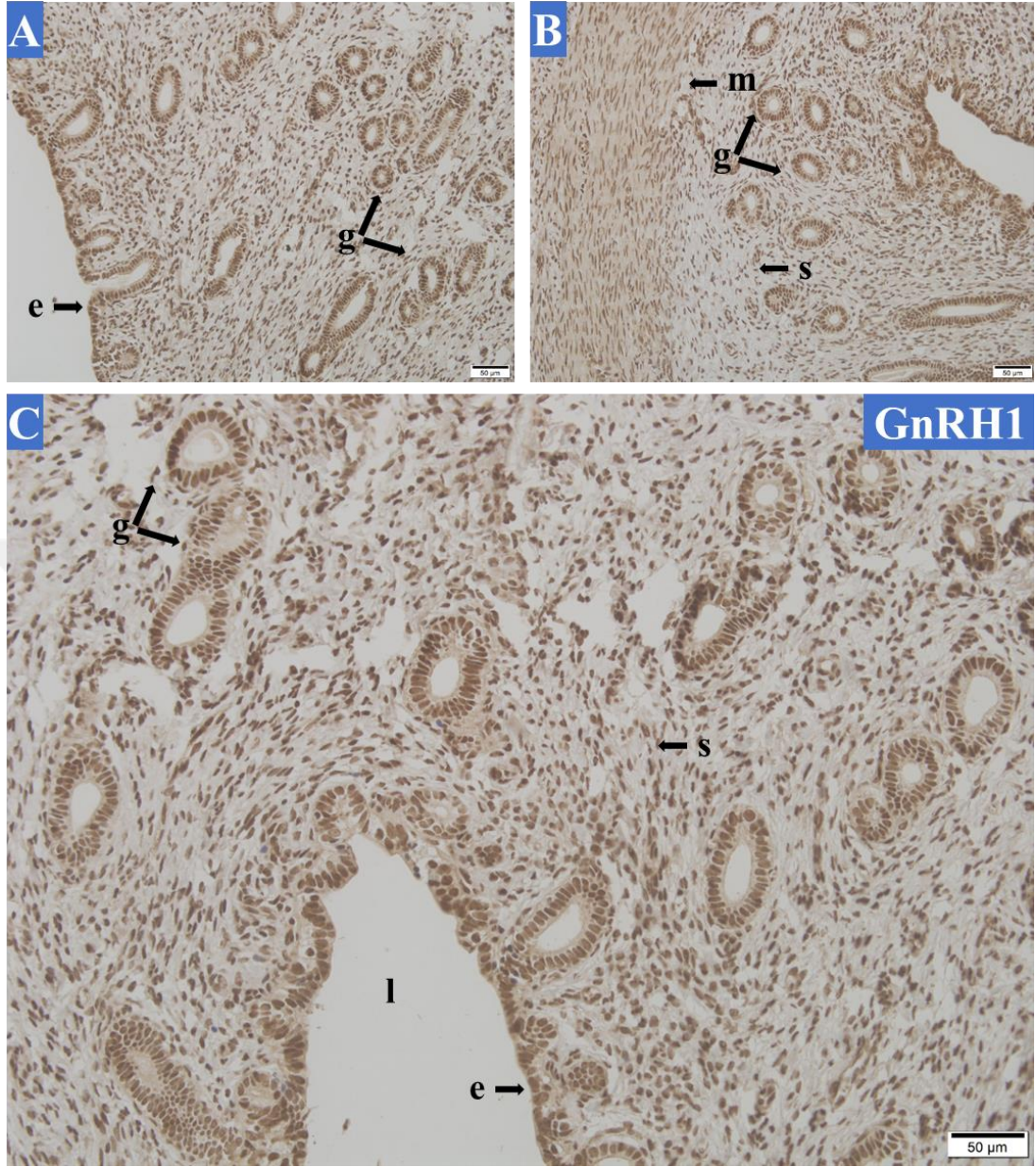
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf , (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 36: Östrus grup GnRH1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: İzotip kontrol (bar: 50µm-20x), B: uterusun katmanları (bar: 200µm-X4), C-D-E: GnRH1'in uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m: miyometriyum, s: endometriyal stroma.



Şekil 37: Non-Östrus grup GnRH1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: GnRH1'in uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.



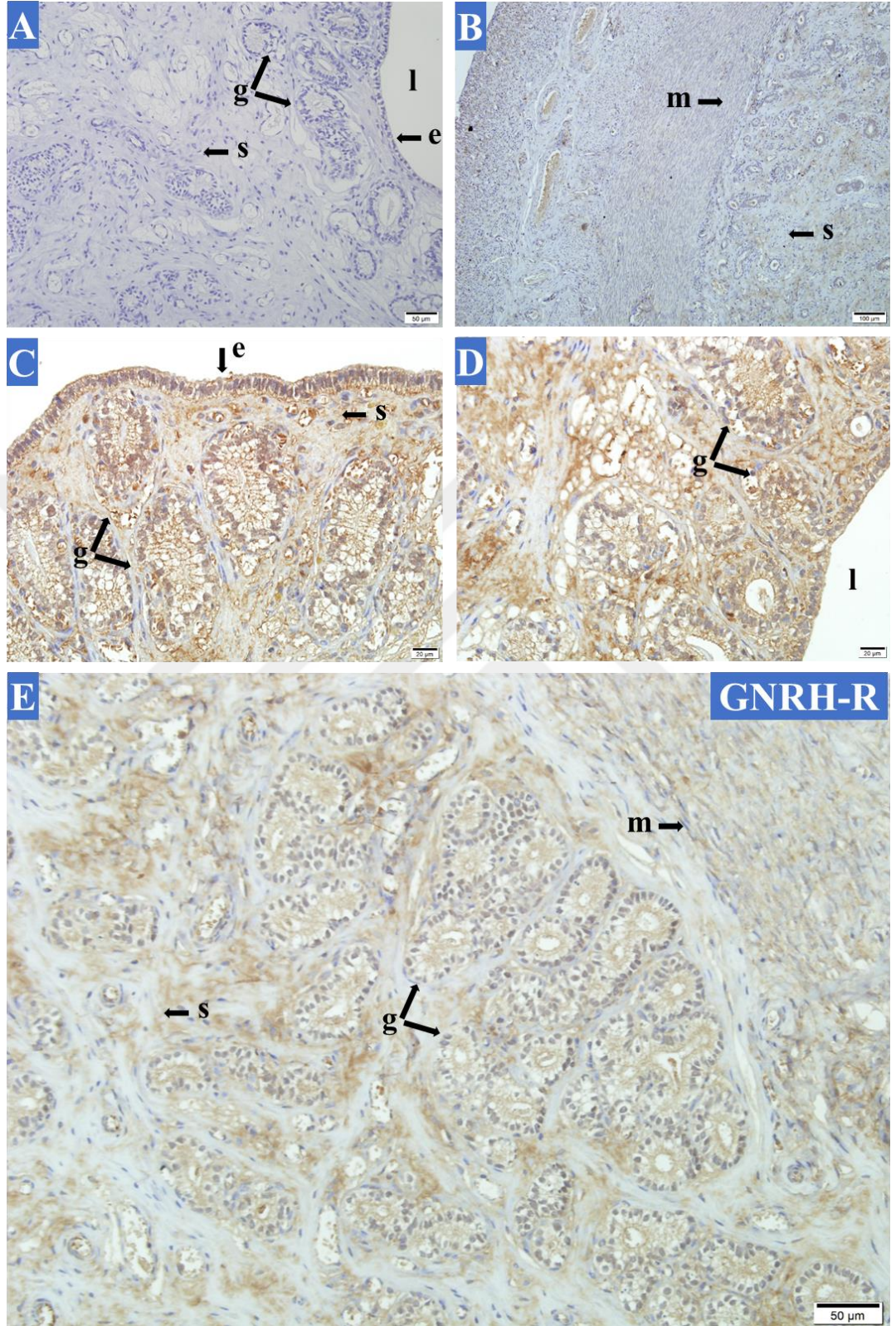
Şekil 38: Kontrol grup GnRH1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: GnRH1'in uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.

GnRH1 ile benzer şekilde GnRH-R'ü de immünohistokimyasal kesitlerde bütün gruplarda uterusun hücresel lokalizasyonlarında pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda uterusun lümen epitel hücrelerinde, endometriyal bezlerde, yüzeysel ve derin uterus bezlerinde, miyositlerde, intersitisyel hücrelerde, endometriyal stromasında farklı derecelerde pozitif immunoreaktivite görüldü (Tablo 16, Şekil 39, 40 ve 41).

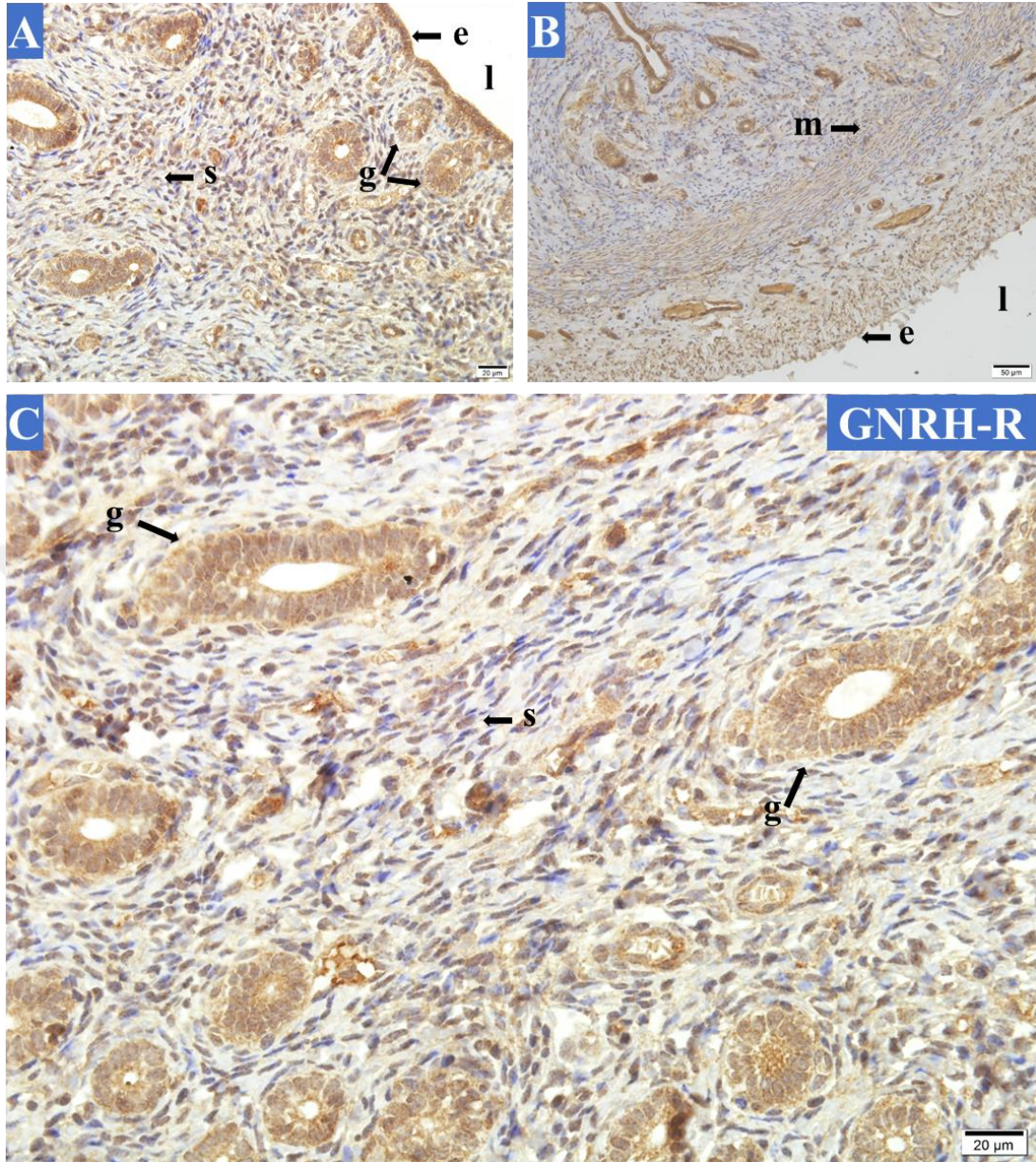
Tablo 16: Uterus dokusunda GnRH-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.

Uterus	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Endometriyum			
Lümen epitel hücreleri	+	++	++
Endometriyal bezler	+	++	++
Yüzeysel uterus bezleri	+	++	++
Derin uterus bezleri	+	+	++
Endometriyal stroma	+	+	+
Miyometriyum			
Miyositler	+	+	+
İnterstisyel hücreler	+	+	+
Miyometriyal stroma	+	+	+

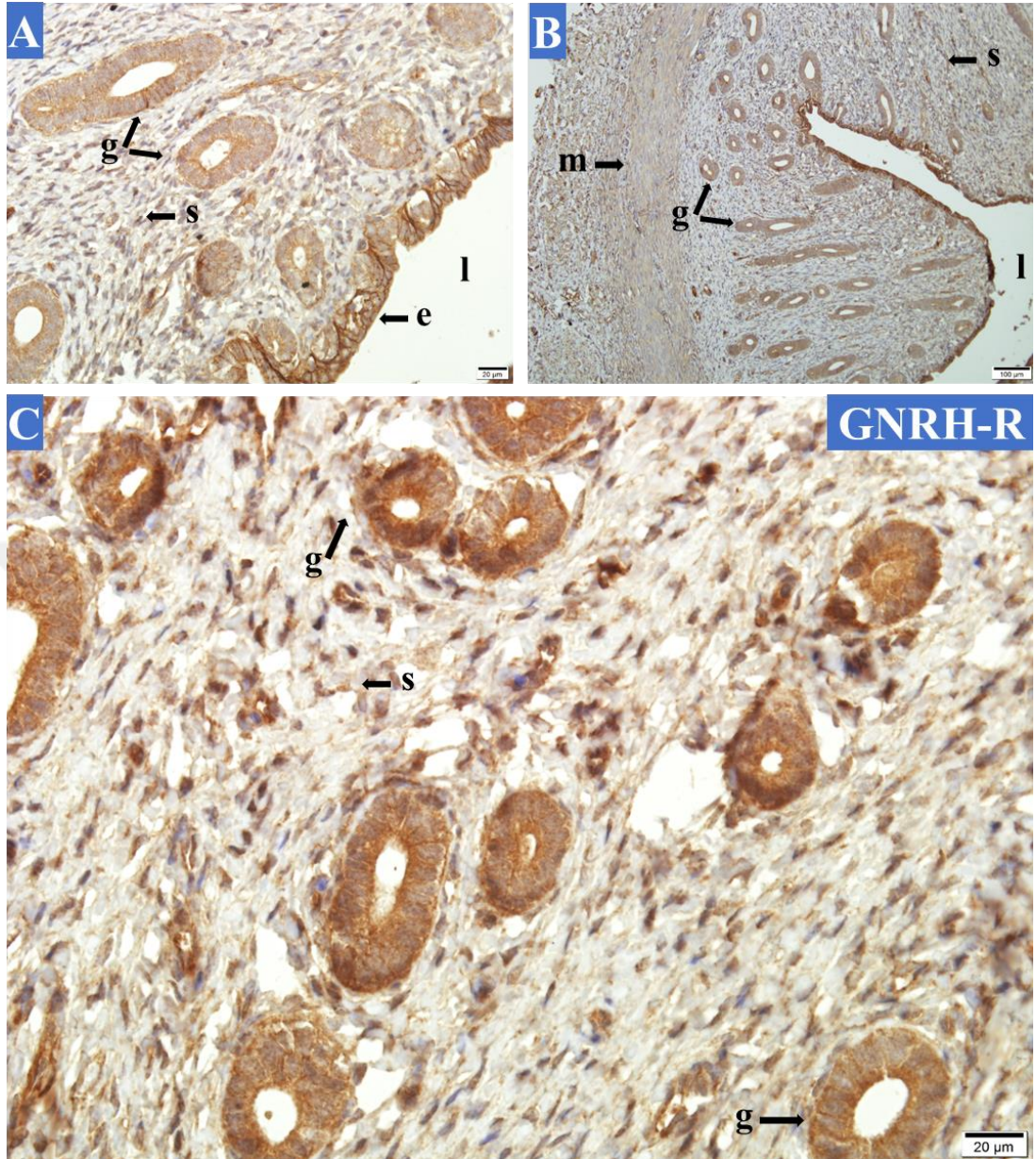
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 39: Östrus grup GnRH-R'ünün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: izotip kontrol (bar: 50µm-X20), B: uterusun katmanları (bar: 100µm-X10), C-D-E: GnRH-R'nün uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (c,d-bar: 20µm-X40, e: bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m: miyometriyum, s: endometriyal stroma.



Şekil 40: Non-Östrus grup GnRH-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: GnRH-R'nün uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,c- bar: 20µm-X40, b-bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.



Şekil 41: Kontrol grup GnRH-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: GnRH-R'nün uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,c- bar: 20µm-X40, b-bar: 100µm-X10), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.

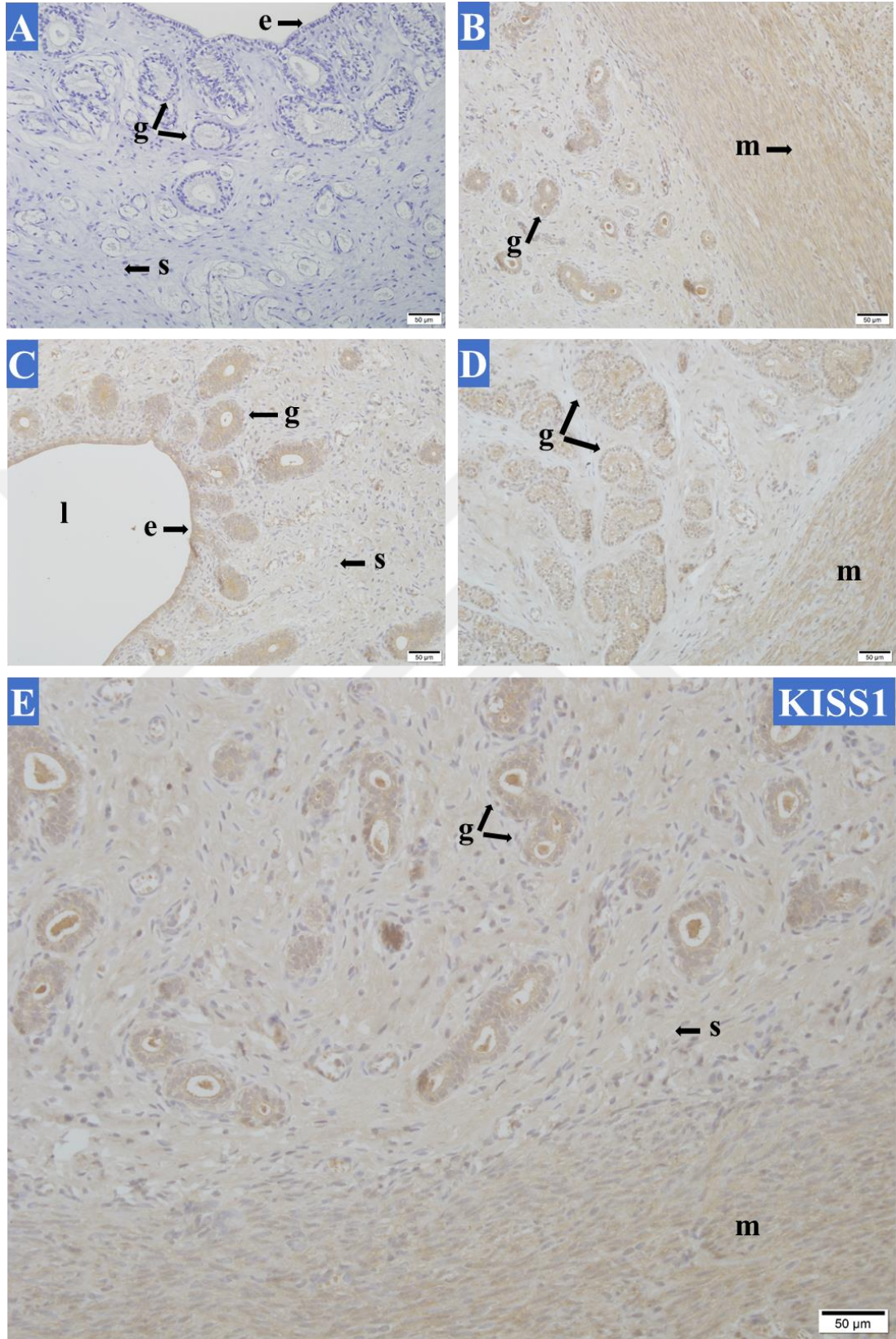
3.7. Uterus Dokusunda KISS1 ve KISS1-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu

İmmünohistokimyasal kesitlerde KISS1'in bütün gruplarda uterusun hücrel lokalizasyonlarında pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda uterusun lümen epitel hücrelerinde, endometriyal bezlerde, yüzeysel ve derin uterus bezlerinde, miyositlerde, intersitisyel hücrelerde, endometriyal stromasında farklı derecelerde pozitif immunoreaktivite görüldü. Uterusun hücrel lokalizasyonlarında gruplar arasında benzer yönde pozitif immunoreaktivite görülürken güçlü immunoreaktivite N-ÖST grubunda lümen epitel hücreleri ve yüzeysel uterus bezlerinde görüldü (Tablo 17, Şekil 42, 43 ve 44).

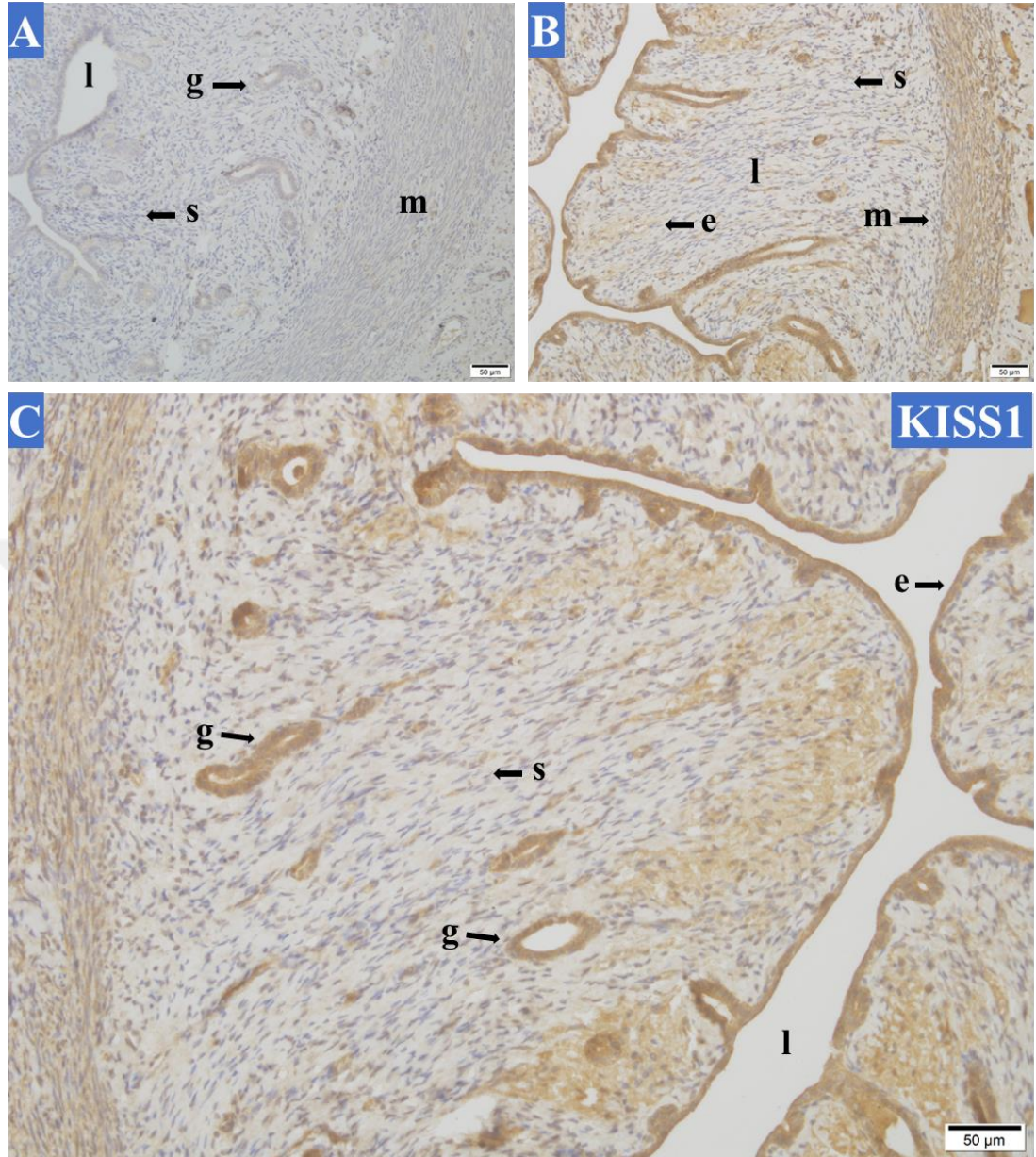
Tablo 17: Uterus dokusunda KISS1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi

Uterus	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Endometriyum			
Lümen epitel hücreleri	+	++	++
Endometriyal bezler	+	++	+
Yüzeysel uterus bezleri	+	++	+
Derin uterus bezleri	+	+	+
Endometriyal stroma	+	+	+
Miyometriyum			
Miyositler	+	+	+
İnterstitiyel hücreler	+	+	+
Miyometriyal stroma	+	+	+

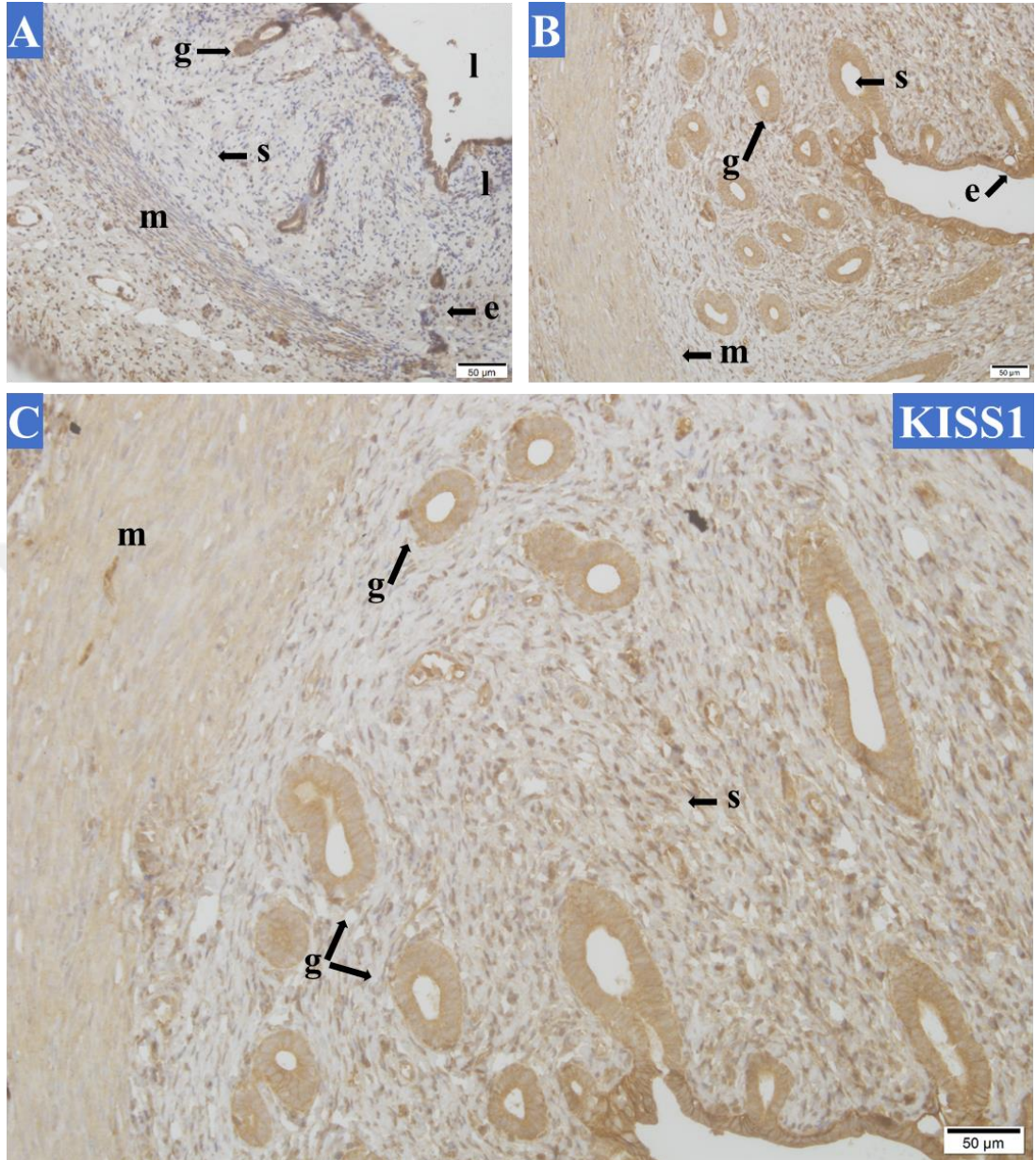
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 42: Östrus grup KISS1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: izotip kontrol (bar: 50µm-X20), B-C-D-E: KISS1'in uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20, e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m: miyometriyum, s: endometriyal stroma.



Şekil 43: Non-Östrus grup KISS1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: KISS1'in uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometrial bezler, l: uterus lümeni, m:miyometriyum, s: endometrial stroma.



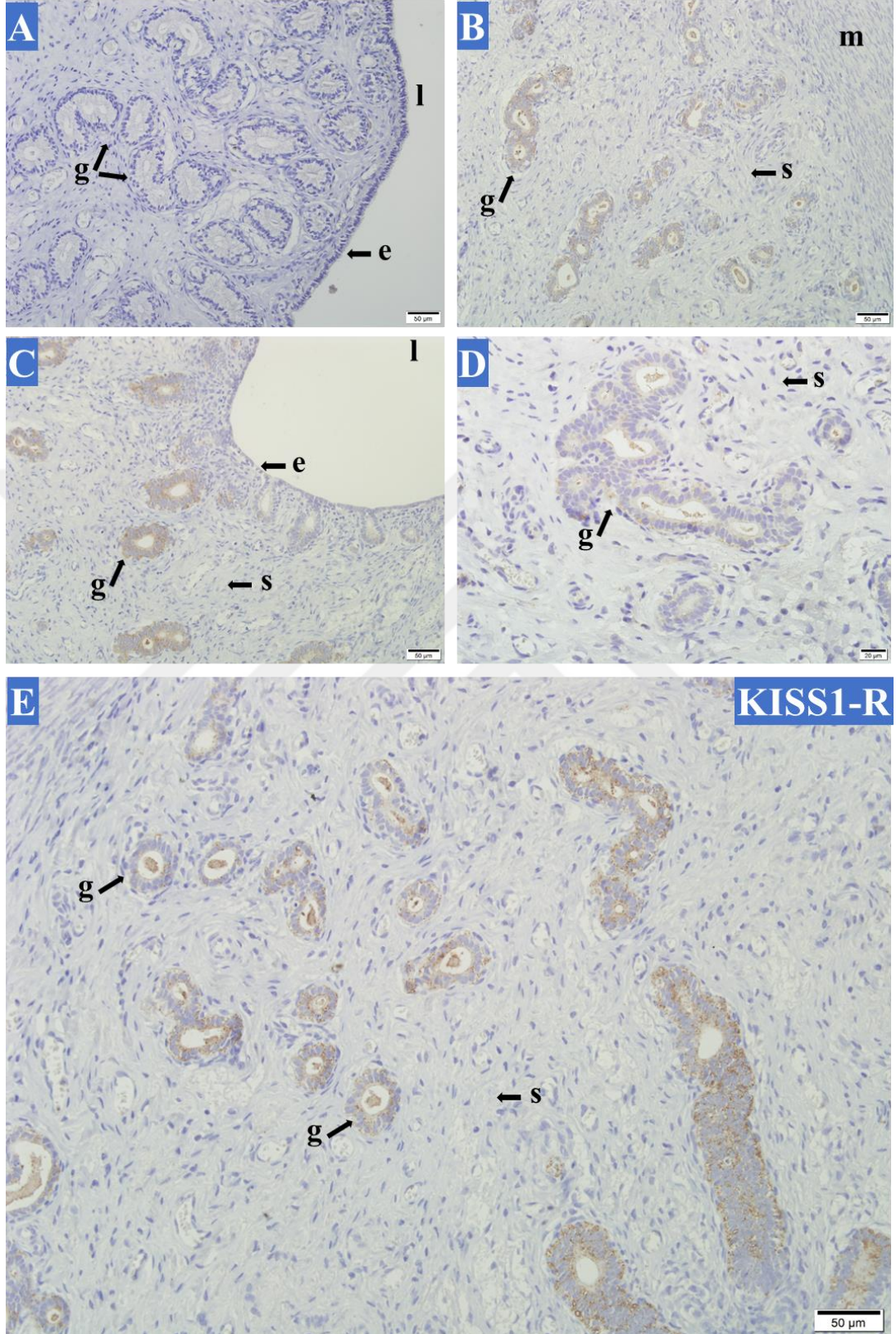
Şekil 44: Kontrol grup KISS1'in uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: KISS1'in uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.

Bütün gruplarda KISS-R'nü uterusun hücresel lokalizasyonlarında genel olarak negatif ve zayıf pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Gruplarda uterusun endometriyal bezleri, yüzeysel ve derin uterus bezlerinde, endometriyal stromada ve intersitisyel hücrelerde çok zayıf ve zayıf immunoreaktivite görülürken; lümen epitel hücreleri, myositler ve bazı gruplarda endometriyal stromada KISS-R'ün immunoreaktivite göstermediği görüldü (Tablo 18, Şekil 45, 46 ve 47).

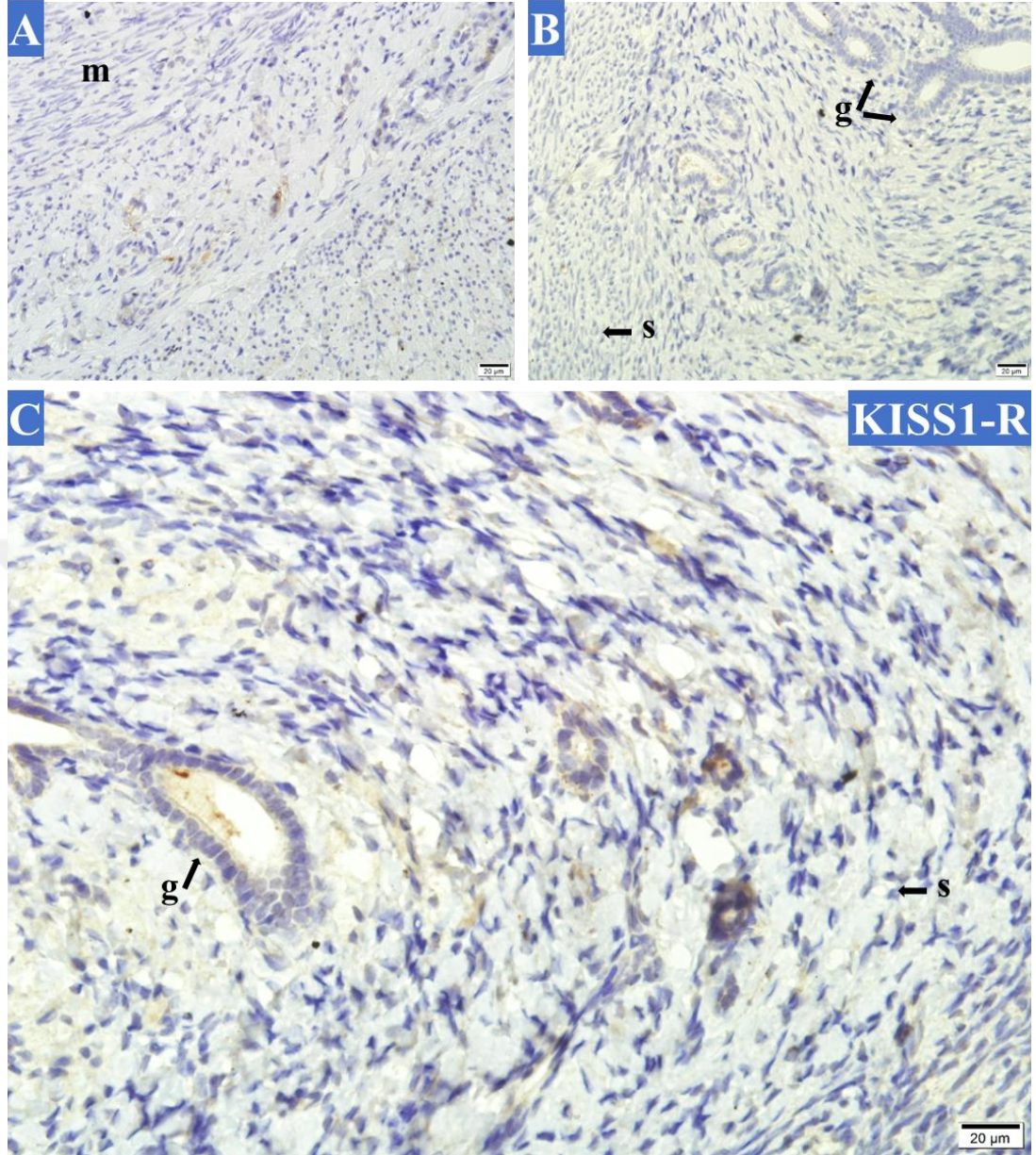
Tablo 18: Uterus dokusunda KISS1-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.

Uterus	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Endometriyum			
Lümen epitel hücreleri	-	-	-
Endometriyal bezler	-/+	-/+	-/+
Yüzeysel uterus bezleri	+	-/+	-/+
Derin uterus bezleri	+	-/+	-
Endometriyal stroma	-	-/+	-
Miyometriyum			
Miyositler	-	-	-
İnterstisyel hücreler	-	-/+	-/+
Miyometriyal stroma	-	-/+	-

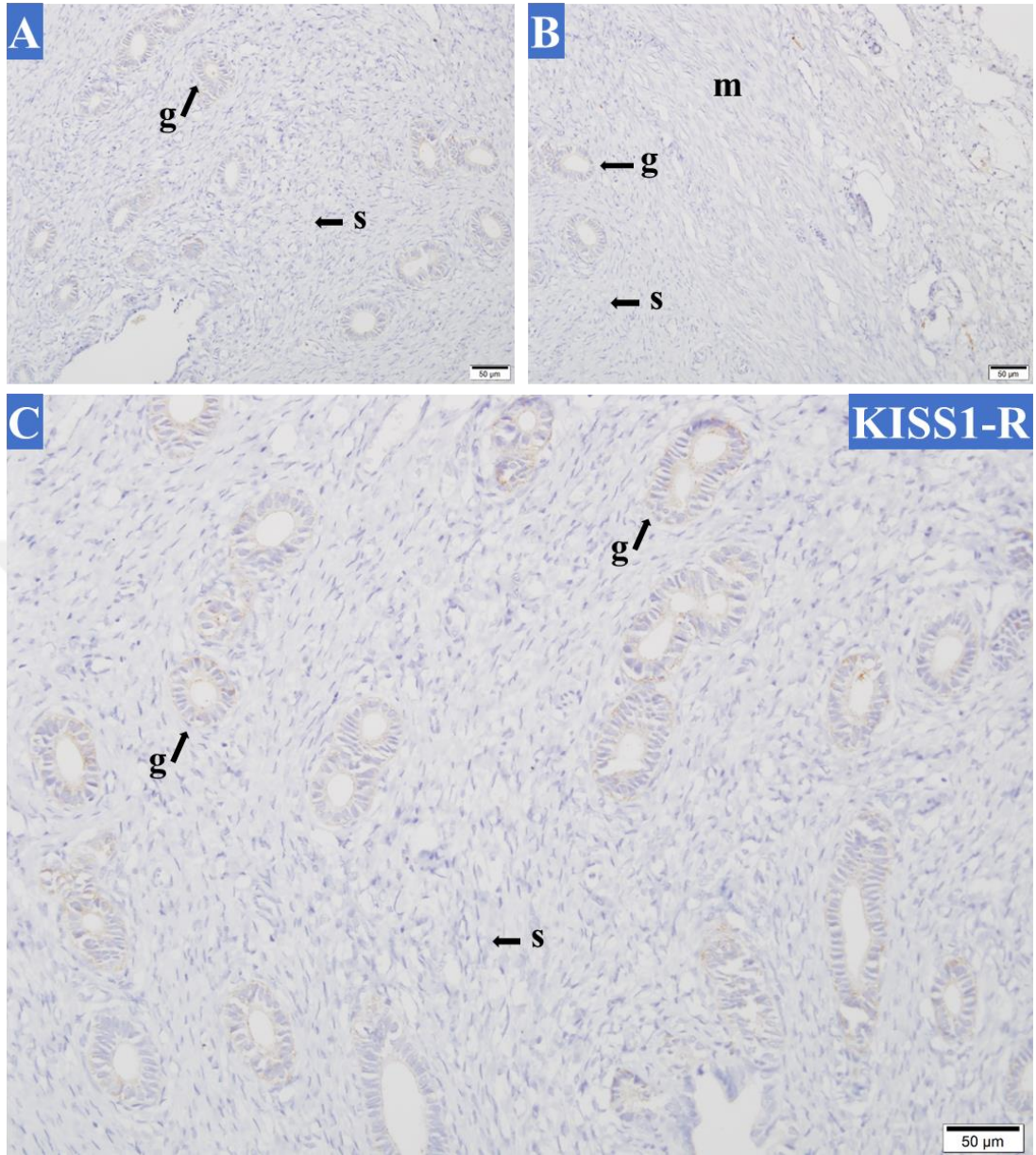
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 45: Östrus grup KISS1-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: izotip kontrol (bar: 50µm-X20), B-C-D-E: KISS1-R'nün uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (b,c,e- bar: 50µm-20x, d-bar: 20µm-X40), e: endometriyum, g: endometriyal bezler, l: uterus lümeni, m: miyometriyum, s: endometriyal stroma.



Şekil 46: Non-Östrus grup KISS1-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: KISS-R'nün uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 20µm-X40), g: endometriyal bezler, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.



Şekil 47: Kontrol grup KISS1-R'nün uterustaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: KISS-R'nün uterusun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 50µm-X20), g: endometriyal bezler, m:miyometriyum, s: endometriyal stroma.

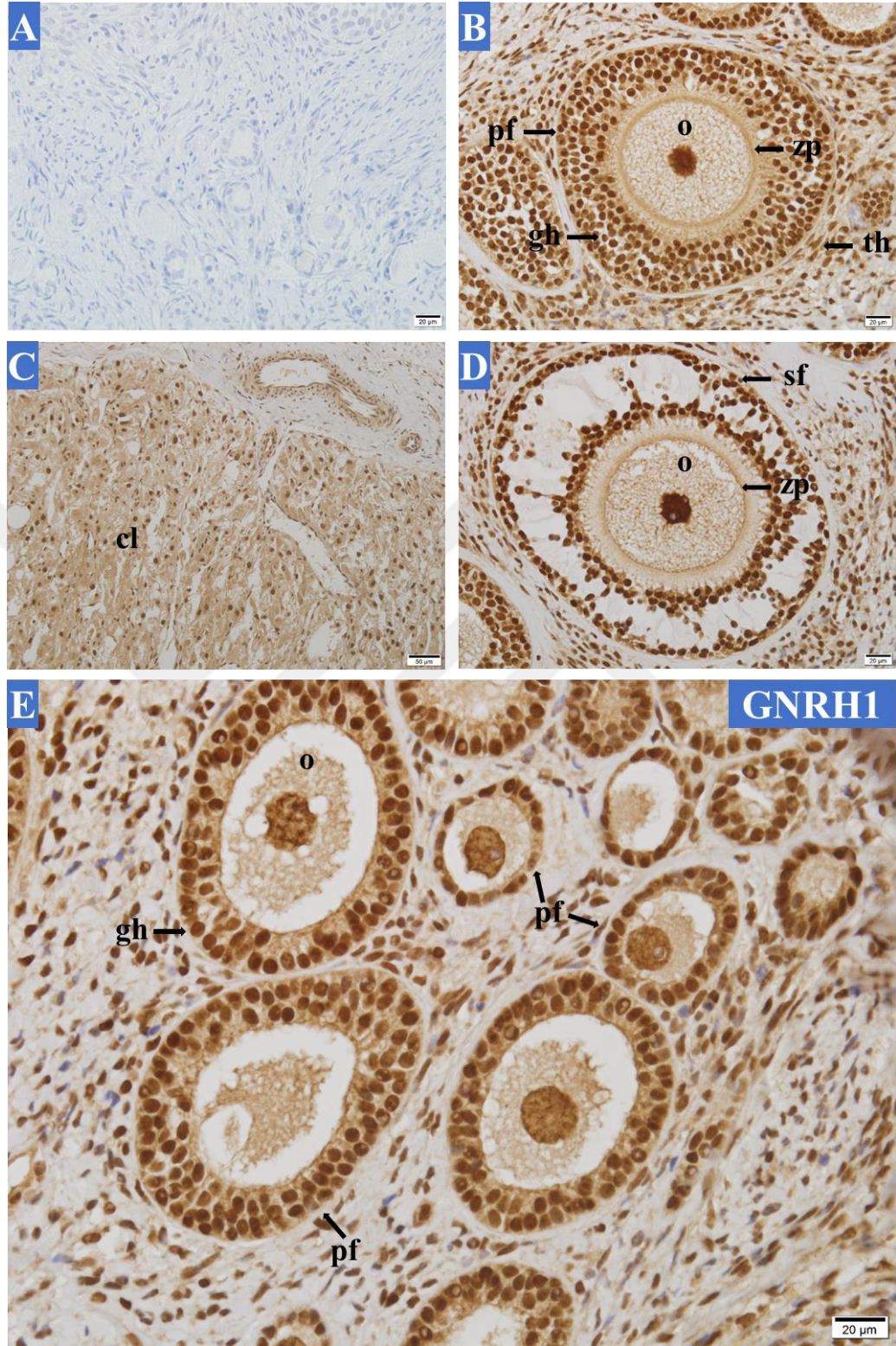
3.8. Ovaryum Dokusunda GnRH1 ve GnRH-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu

İmmünohistokimyasal kesitlerde GnRH1'in bütün gruplarda ovaryumun hücresel lokalizasyonlarında pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda ovaryum dokusundaki foliküllerde (primer, sekunder), oositlerde, zona pelusidada, granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve endokrin interstisyel hücrelerde farklı derecelerde pozitif immunoreaktivite görüldü. N-ÖST ve KONT grubunda bulunmayan, ÖST grubunda bulunan corpus luteum'da da (CL) pozitif immunoreaktivite görüldü. Ayrıca deslorelin implant uygulanan köpeklerde hem ÖST hem de N-ÖST gruplarında graaf folikülleri olmadığından yalnızca KONT grubunda graaf folikülü orta düzeyde pozitif immunoreaktivite görüldü (Tablo 19, Şekil 48, 49 ve 50).

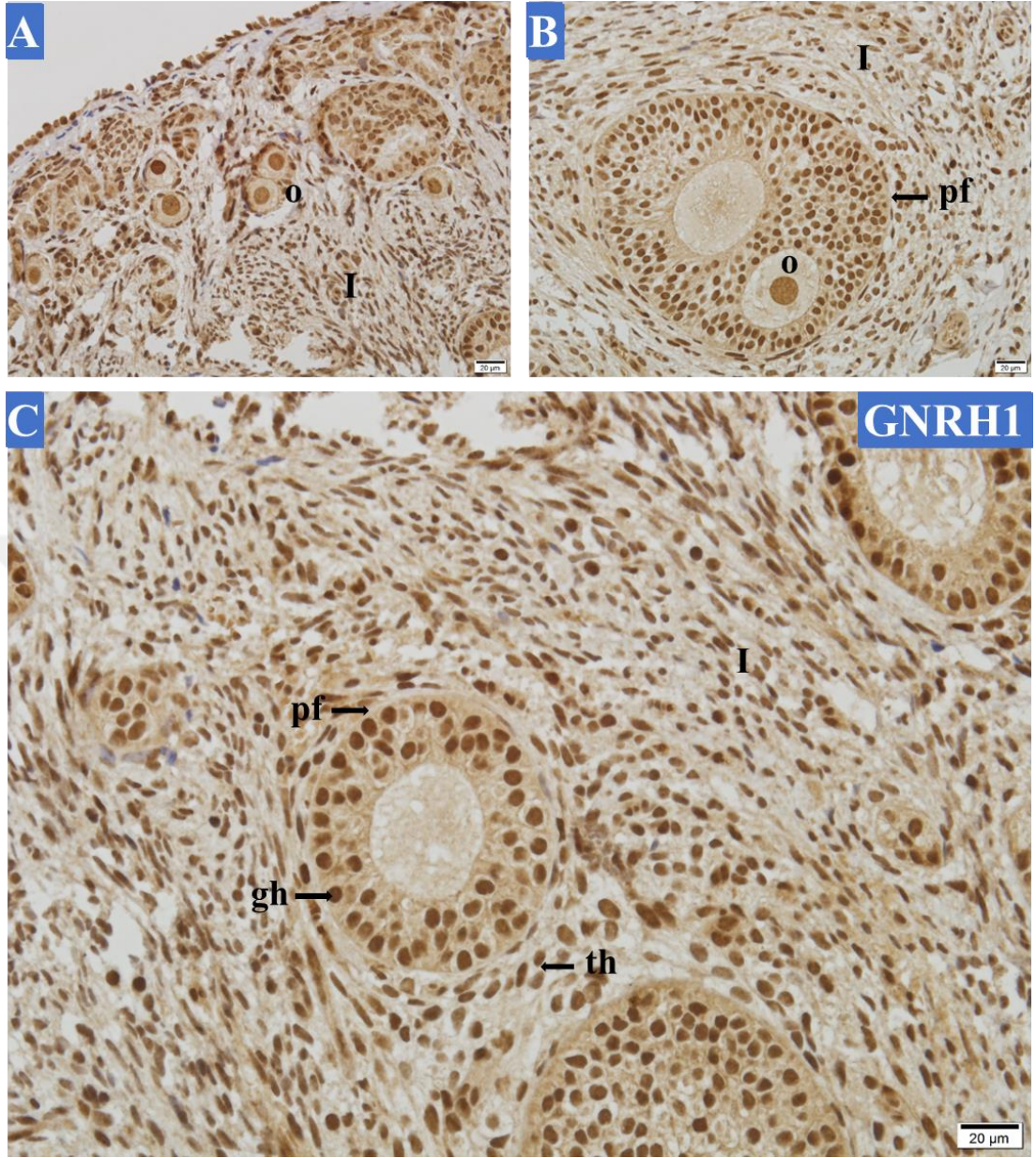
Tablo 19: Ovaryum dokusunda GnRH1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.

Ovaryum	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Primer folikül	++	++	++
Sekonder folikül	++	Yok	++
Graaf folikül	Yok	Yok	+
Oosit	++	++	++
Zona pelusida	+	+	+
Corpus luteum	++	Yok	Yok
Granüloza hücresi	++	++	++
Teka hücresi	++	++	++
Endokrin interstisyel hücreler	+	+	+

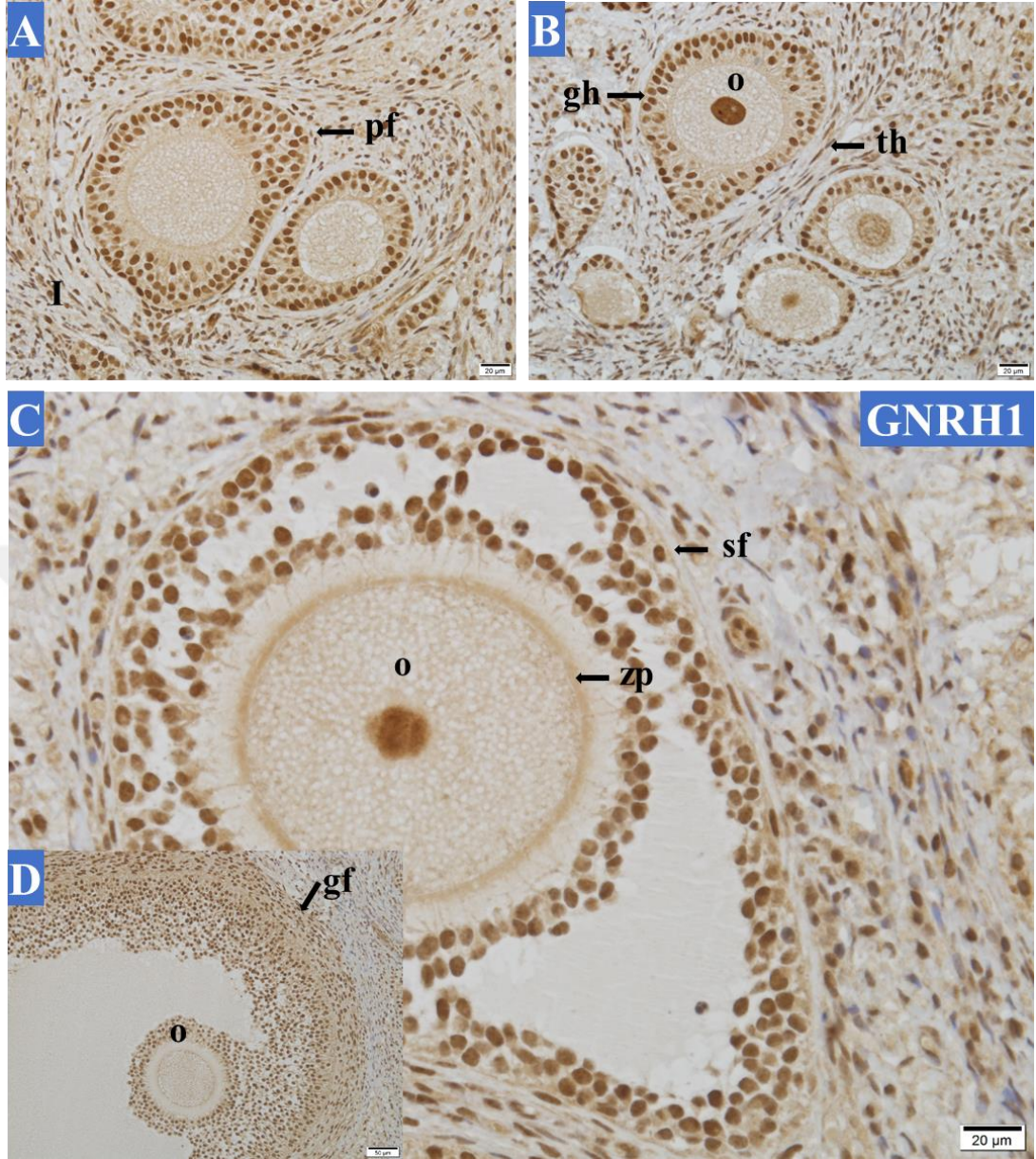
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 48: Östrus grup GnRH1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: izotip kontrol (bar: 20µm-X40), B-C-D-E: GnRH1'in ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 20µm-X40), c: ovaryum üzerindeki lüteal alan (bar: 50µm-X20), cl: corpus lüteum, gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.



Şekil 49: Non-Östrus grup GnRH1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: GnRH1'in ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 20µm-X40), g: germinal epitel (ovaryum epitel), gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, th: teka hücresi.



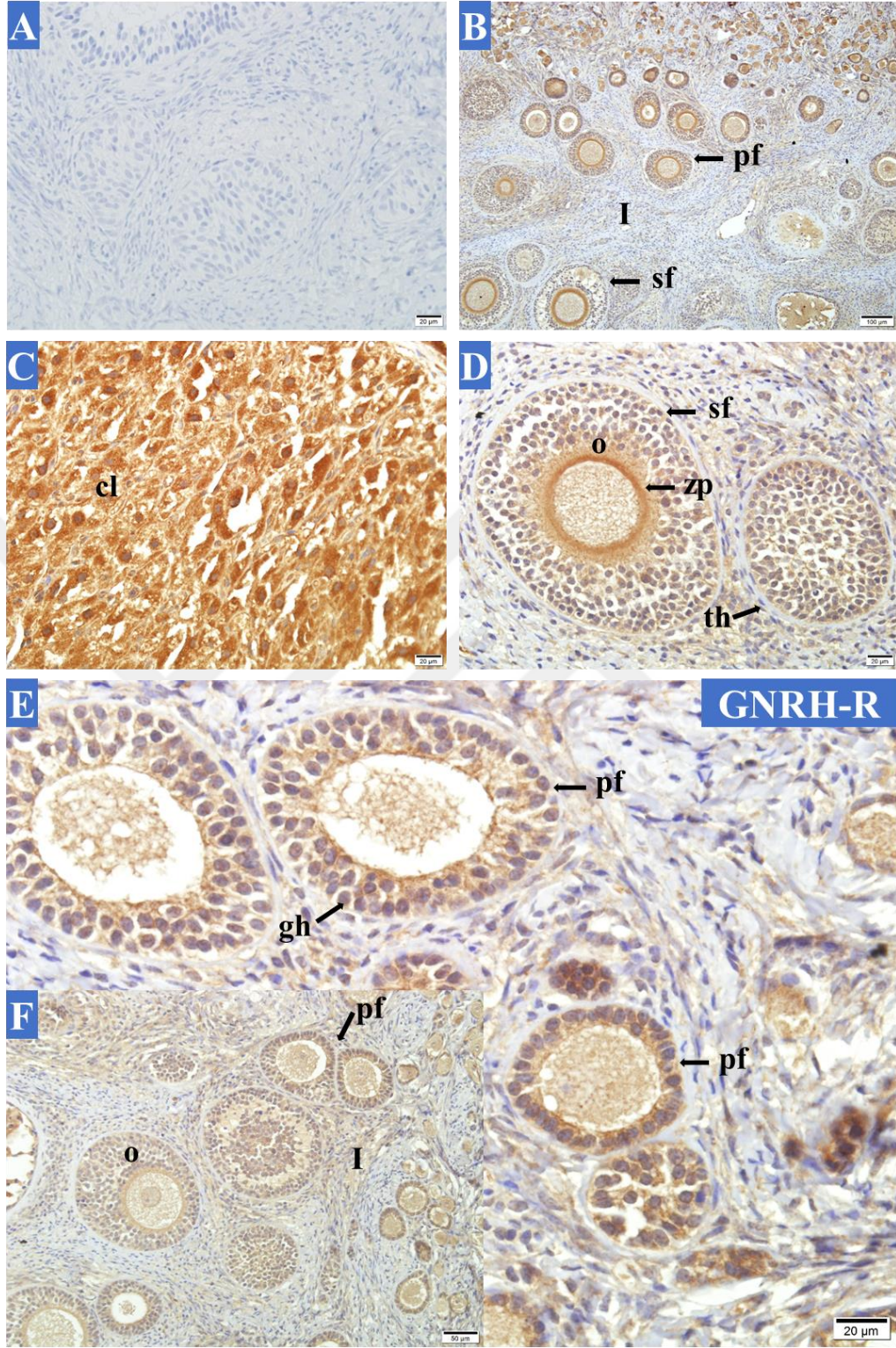
Şekil 50: Kontrol grup GnRH1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C-D: GnRH1'in ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,b,c- bar: 20µm-X40, d-bar: 50µm-X20), g: germinal epitel (ovaryum epiteli), gf: graaf folikül, gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.

GnRH1 ile benzer şekilde GnRH-R'ü de immünohistokimyasal kesitlerde bütün gruplarda ovaryumun hücresel lokalizasyonlarında pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda ovaryum dokusundaki foliküllerde (primer, sekonder), oositlerde, zona pelusidada, granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve endokrin interstisyel hücrelerde farklı derecelerde pozitif immunoreaktivite görüldü. N-ÖST ve KONT grubunda bulunmayan, ÖST grubunda bulunan corpus luteum'da da (CL) pozitif immunoreaktivite görüldü. GnRH1'de olduğu gibi aynı şekilde deslorelin implant uygulanan köpeklerde hem ÖST hem de N-ÖST gruplarında graaf folikülleri olmadığından KONT grubunda graaf folikülü orta düzeyde pozitif immunoreaktivite görüldü (tablo 20, şekil 51, 52 ve 53).

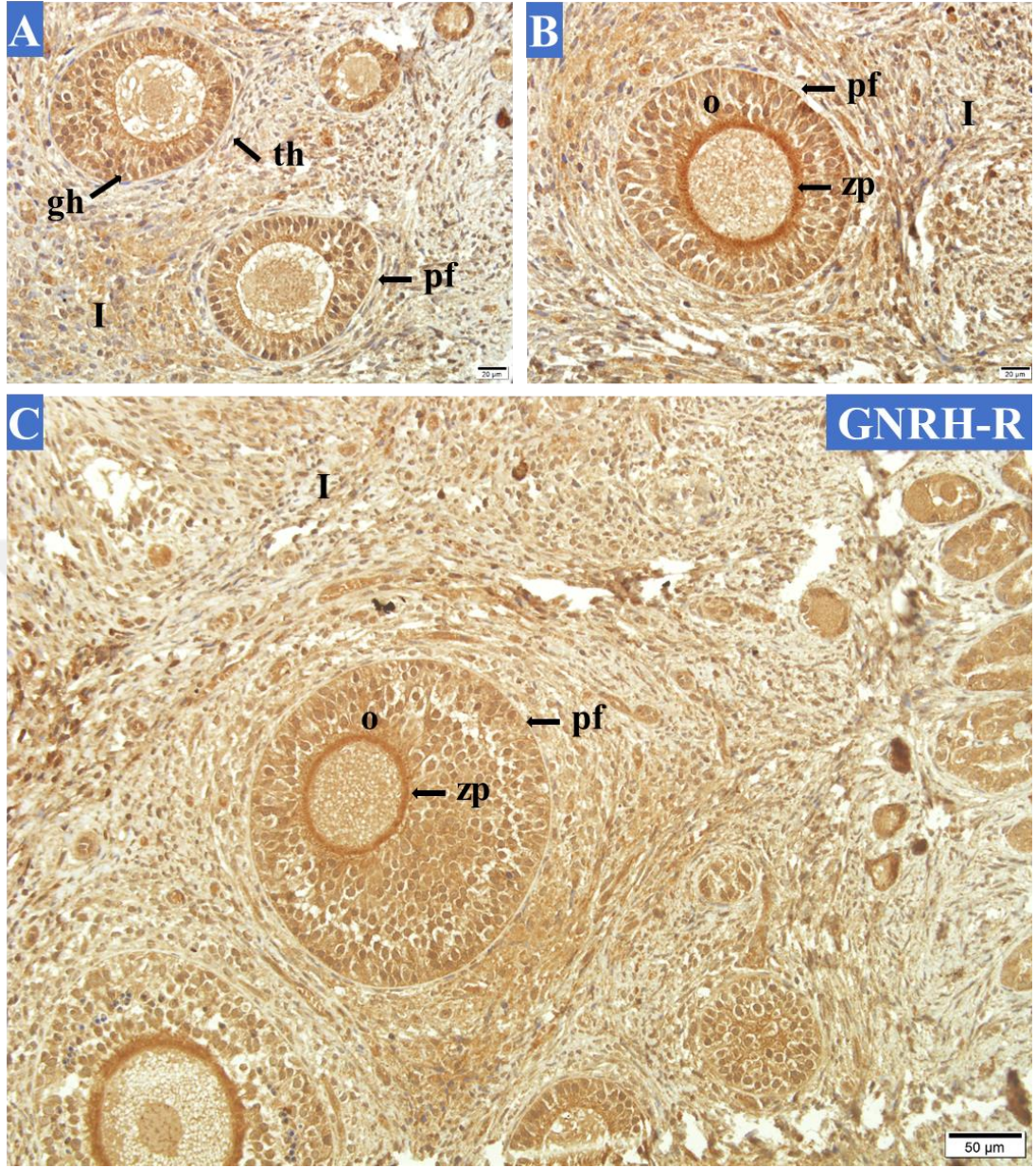
Tablo 20: Ovaryum dokusunda GnRH-R'ün hücre düzeyinde immünoaktivitesi.

Ovaryum	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Primer folikül	++	++	+
Sekonder folikül	+	Yok	+
Graaf folikül	Yok	Yok	+
Oosit	+	++	+
Zona pelusida	++	++	++
Corpus luteum	++	Yok	Yok
Granüloza hücresi	++	++	+
Teka hücresi	-/+	+	-/+
Endokrin interstisyel hücreler	+	++	+

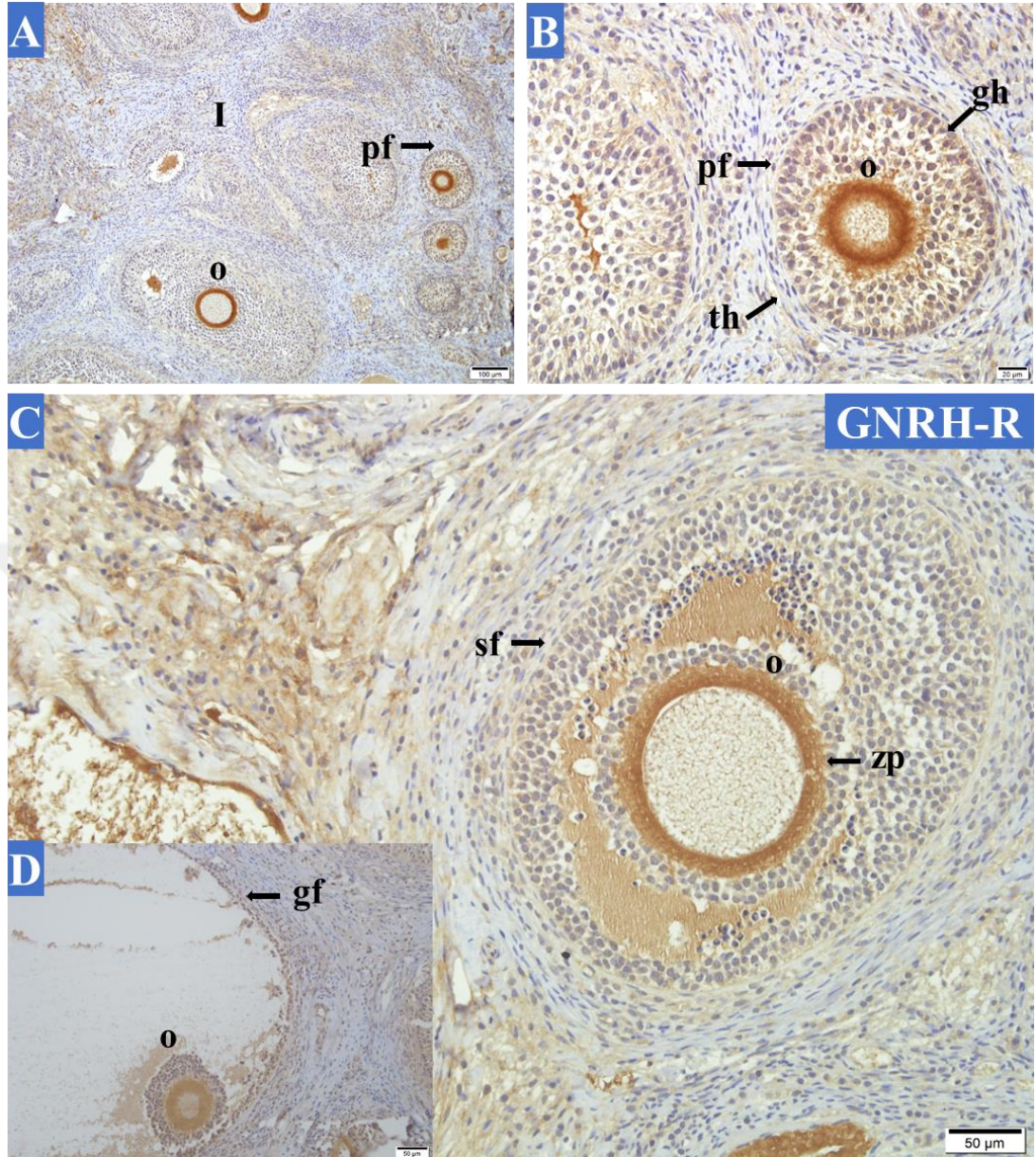
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 51: Östrus grup GnRH-R'nün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: izotip kontrol (bar: 20µm-X40), B-C-D-E-F: GnRH-R'nün ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,c,d,e- bar: 20µm-X40, b-bar: 100µm-X10, f-bar: 50µm-X20),gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.



Şekil 52: Non-Östrus grup GnRH-R'nün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: GnRH-R'nün ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,b- bar: 20µm-X40, c-bar: 50µm-X20), gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, prf: primordiyal folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.



Şekil 53: Kontrol grup GnRH-R'nün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C-D: GnRH-R'nün ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a- bar: 100µm-X10, b-bar: 50µm-X20, c,d-bar: 20µm-X40,), gf: graaf folikül, gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.

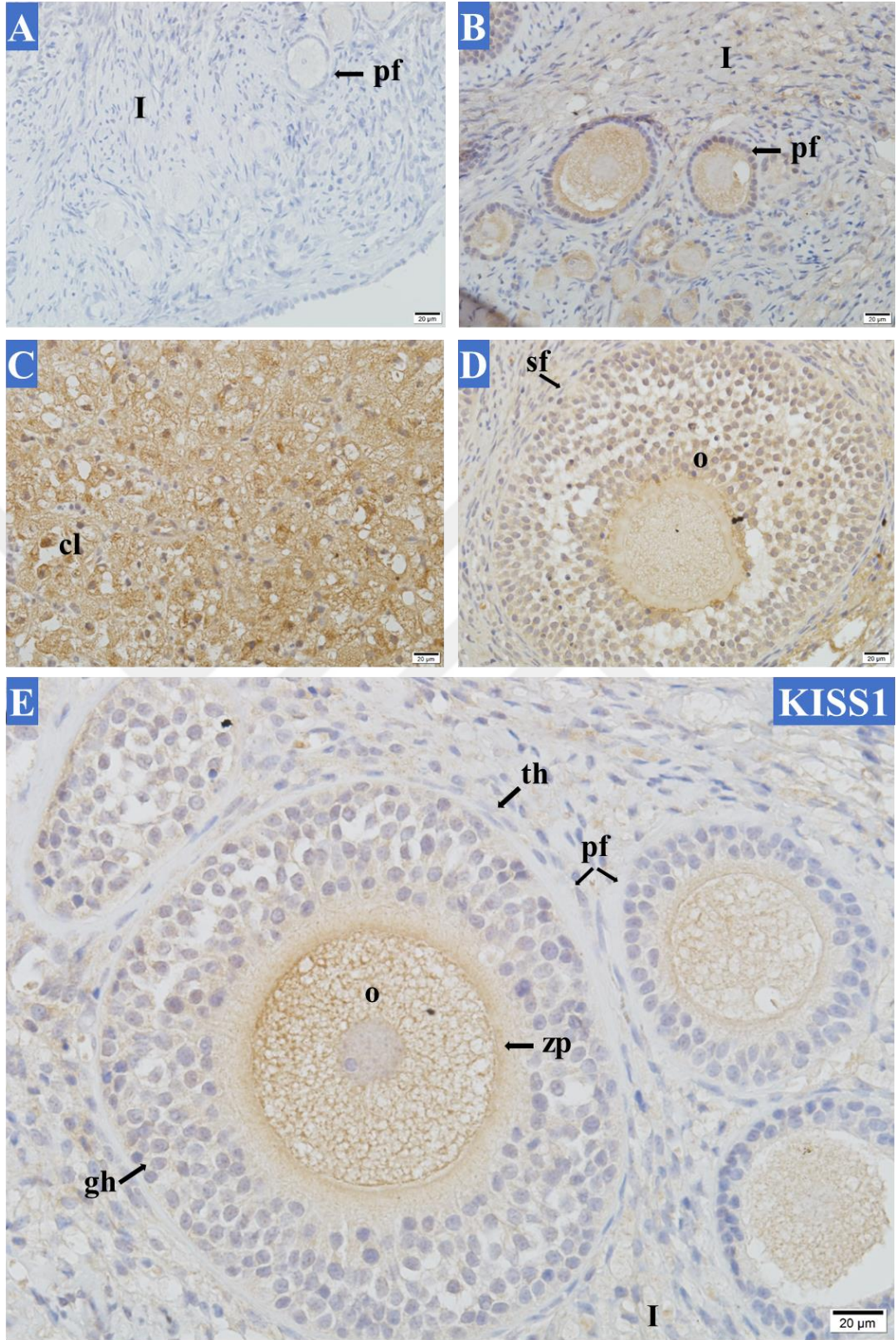
3.9. Ovaryum Dokusunda KISS1 ve KISS1-R'ün İmmünohistokimyasal Lokalizasyonu

İmmünohistokimyasal kesitlerde KISS1'in bütün gruplarda ovaryumun var olan hücresel lokalizasyonlarında pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda ovaryum dokusundaki foliküllerde (primer, sekonder), oositlerde, zona pelusidada, granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve endokrin interstisyel hücrelerde farklı derecelerde pozitif immunoreaktivite görüldü. N-ÖST ve KONT grubunda bulunmayan, ÖST grubunda bulunan corpus luteum'da da (CL) ve yalnızca KONT grubunda bulunan graaf folikülündede orta düzeyde pozitif immunoreaktivite görüldü. Ayrıca tüm gruplarda en zayıf immunoreaktivite teka hücrelerinde görüldü (Tablo 21, Şekil 55, 55 ve 56).

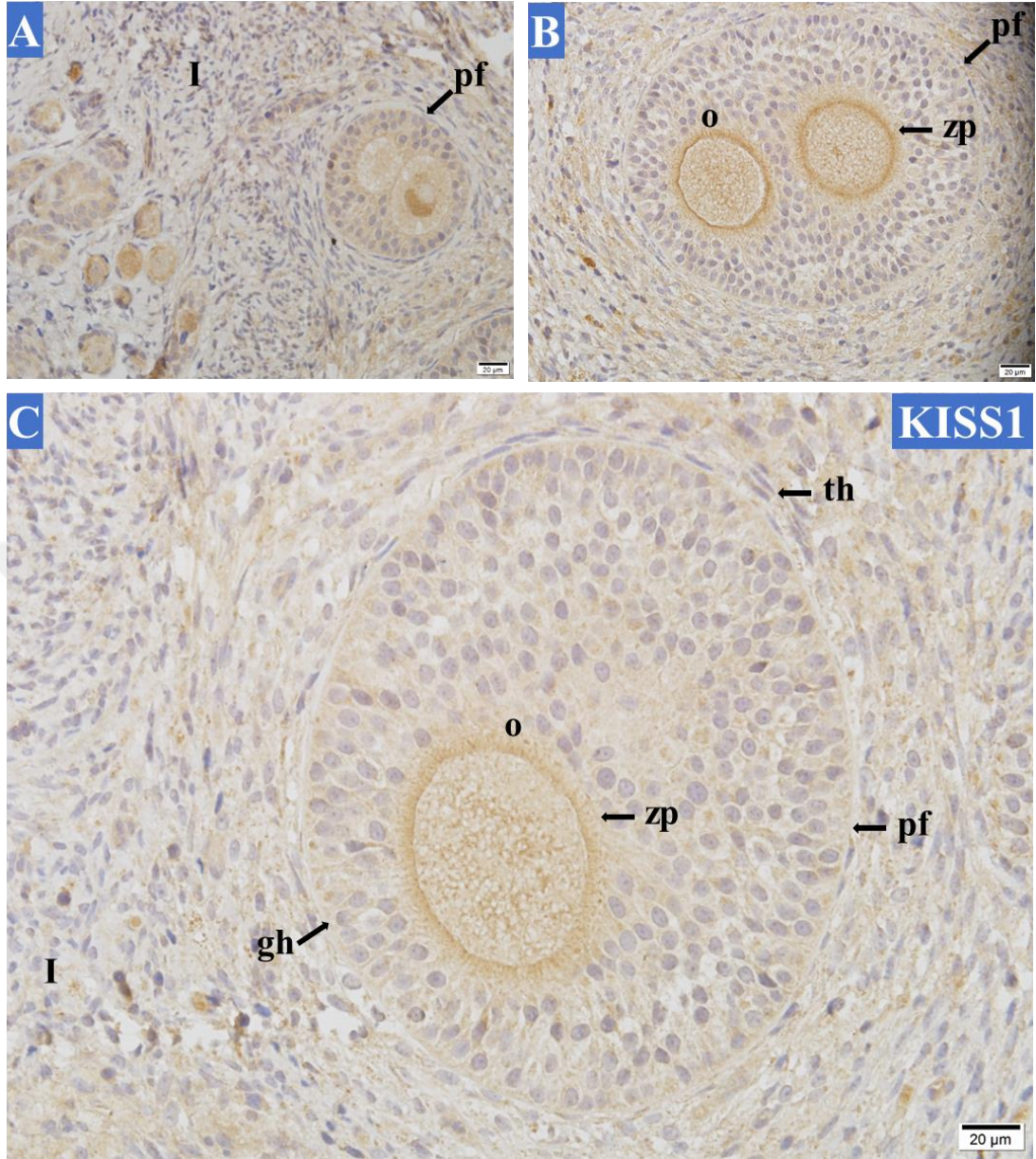
Tablo 21: Ovaryum dokusunda KISS1'in hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.

Ovaryum	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Primer folikül	+	+	+
Sekonder folikül	+	Yok	+
Graaf folikül	Yok	Yok	+
Oosit	+	++	++
Zona pelusida	+	+	++
Corpus luteum	+	Yok	Yok
Granüloza hücresi	+	+	++
Teka hücresi	-/+	-/+	-/+
Endokrin interstisyel hücreler	+	-/+	+

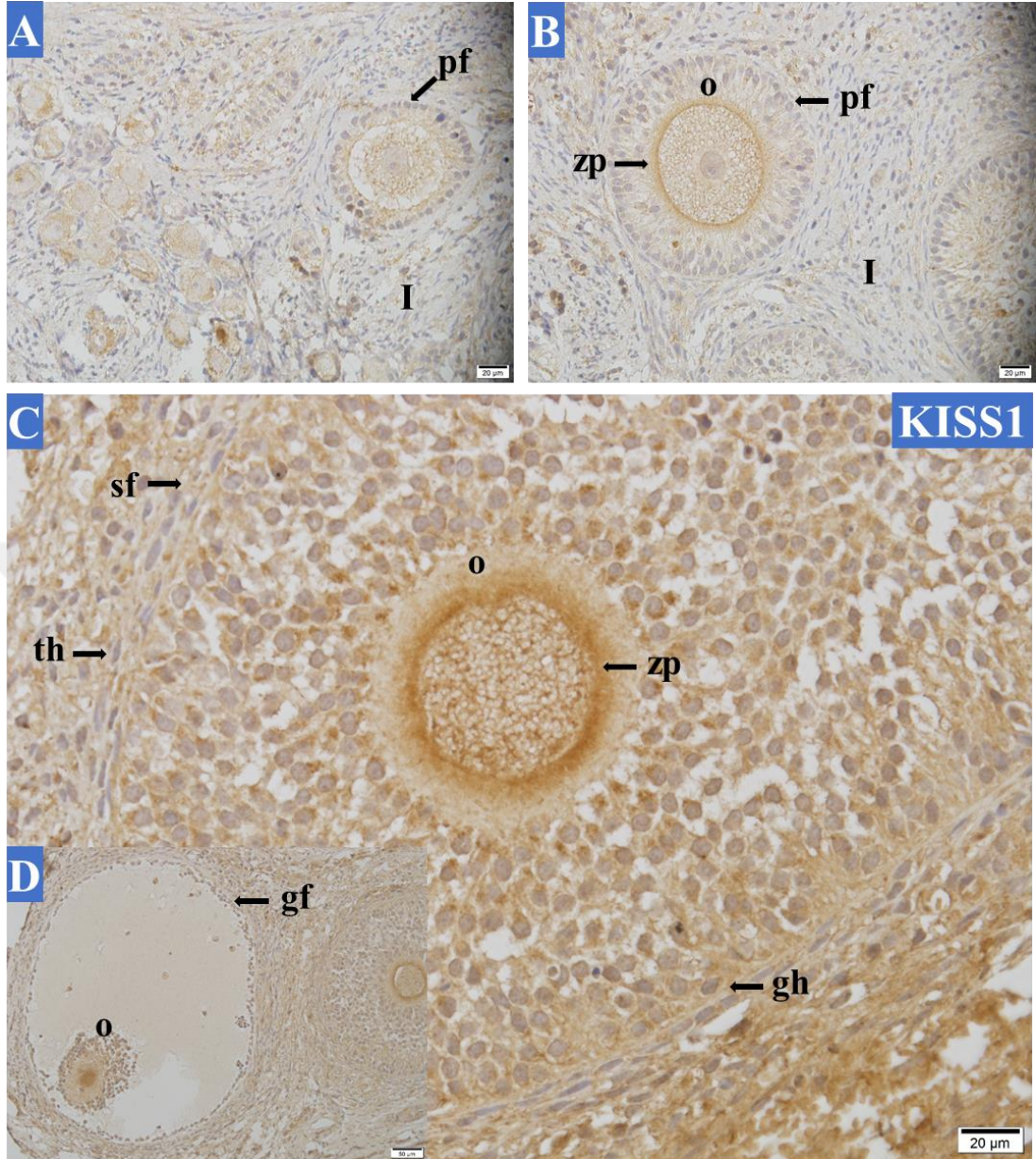
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 54: Östrus grup KISS1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; **A:** izotip kontrol (bar: 20µm-X40), B-C-D-E: KISS1'in ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 20µm-X40), **c:** ovaryum üzerindeki lüteal alan (bar: 20µm-X40), **cl:** corpus luteum, **gh:** granüloza hücresi, **I:** endokrin interstisyel hücreler, **o:** oosit, **pf:** primer folikül, **sf:** sekonder folikül, **th:** teka hücresi, **zp:** zona pelusida.



Şekil 55: Non-Östrus grup KISS1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C: KISS1'in ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 20µm-X40), gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.



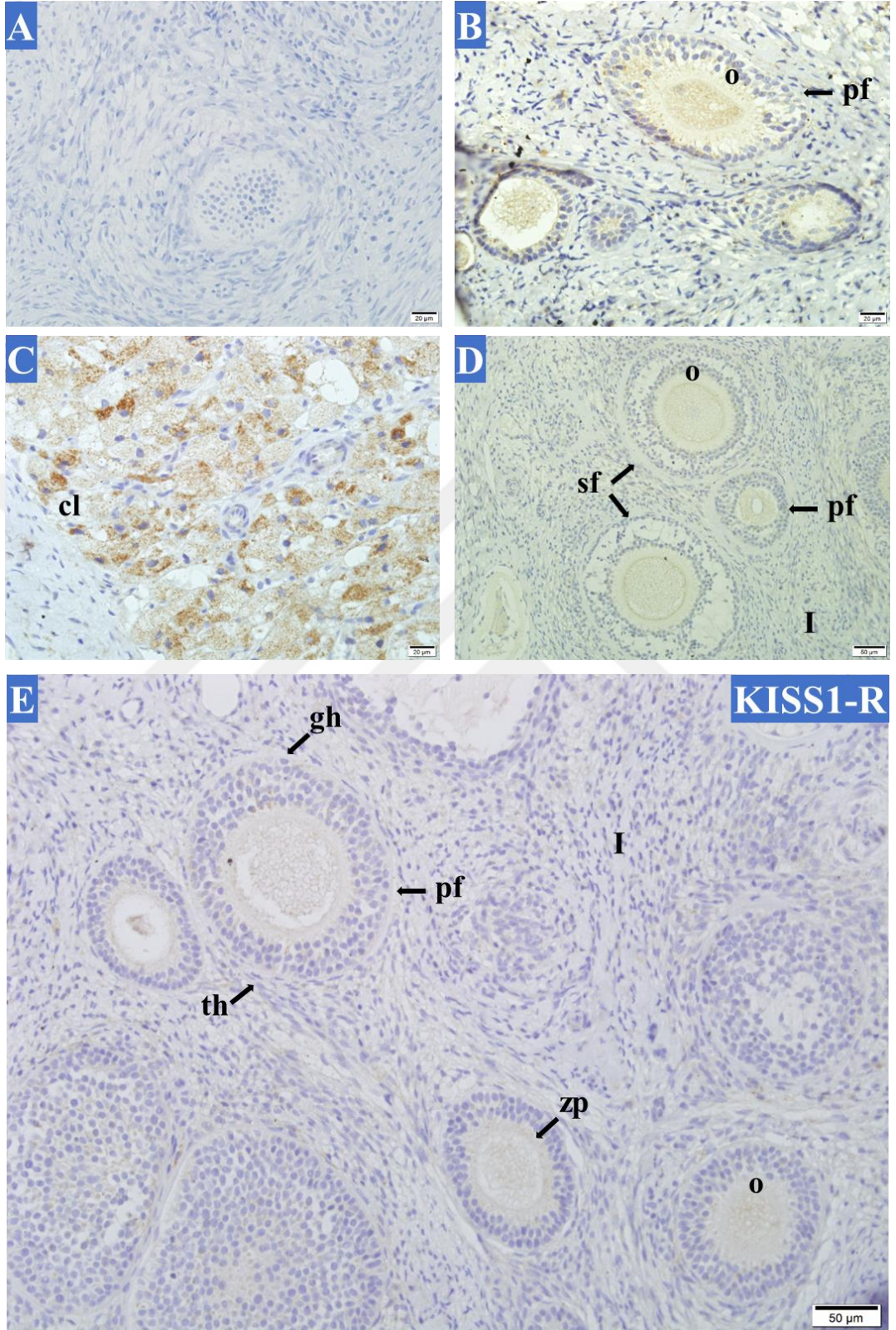
Şekil 56: Kontrol grup KISS1'in ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C-D: KISS1'in ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,b,c- bar: 20µm-X40, d-bar: 50µm-X20), gf: graaf folikül, gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.

KISS1-R'ün genel olarak bütün gruplarda ovaryumun var olan hücresel lokalizasyonlarında negatif ve zayıf pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Tüm gruplarda ovaryum dokusundaki foliküllerde (primer, sekonder), oositlerde, zona pelusidada, granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde, endokrin interstisyel hücrelerde ve germinal epitel hücrelerinde zayıf pozitif ve farklı derecelerde pozitif immunoreaktivite görüldü. N-ÖST ve KONT grubunda bulunmayan, ÖST grubunda bulunan corpus luteum'da da (CL) ve yalnızca KONT grubunda bulunan graaf folikülündede orta düzeyde pozitif immunoreaktivite görüldü. Ayrıca tüm gruplarda en zayıf immunoreaktivite teka hücrelerinde ve endokrin intersitisyel hücrelerde görüldü (Tablo 22, Şekil 57, 58 ve 59).

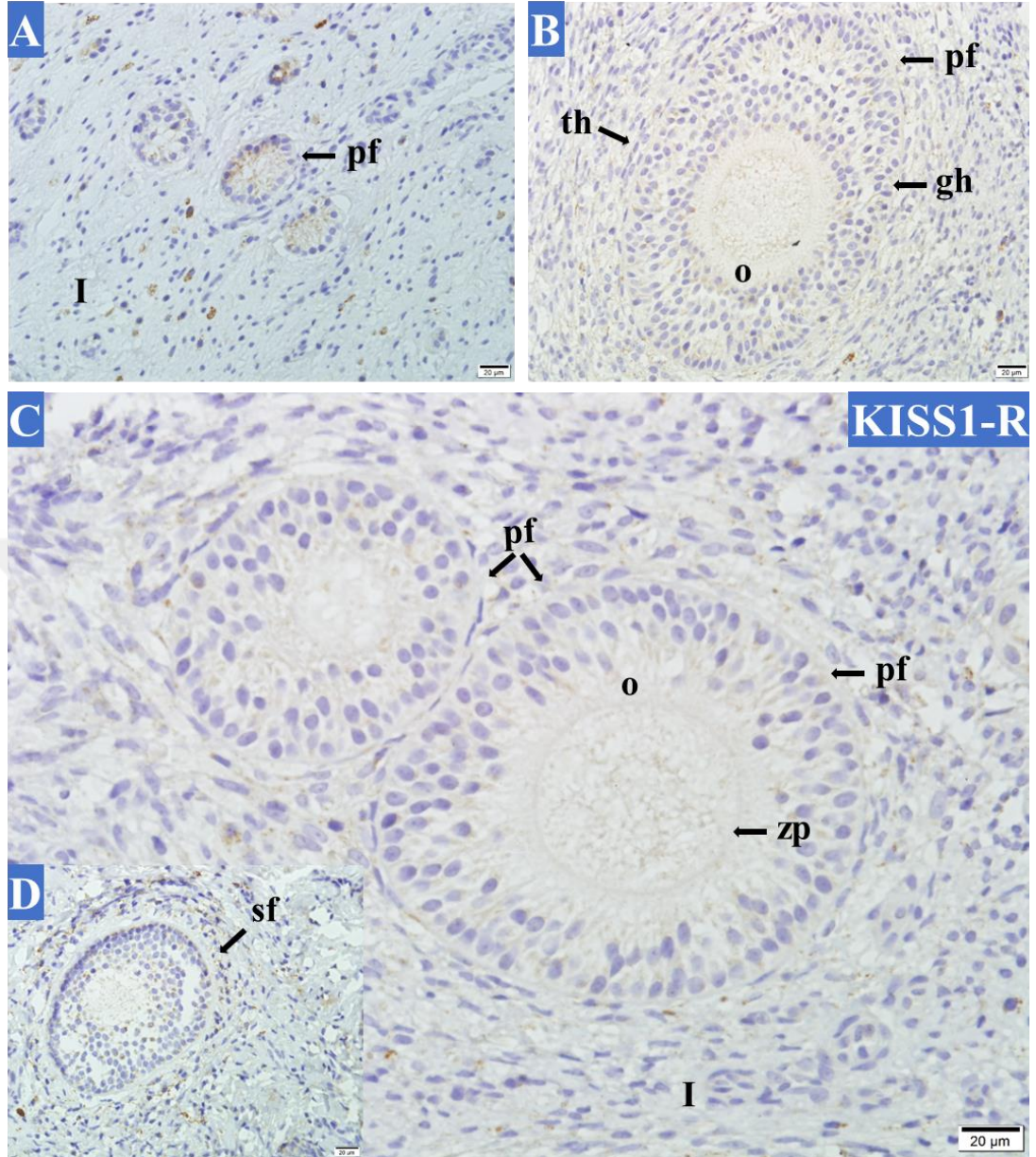
Tablo 22: Ovaryum dokusunda KISS1-R'ün hücre düzeyinde immünoreaktivitesi.

Ovaryum	Gruplar		
	ÖST (n=6)	N-ÖST (n=10)	KONT (n=9)
Primer folikül	+	-/+	+
Sekonder folikül	+	-/+	+
Graaf folikül	Yok	Yok	+
Oosit	+	+	+
Zona pelusida	-/+	-/+	+
Corpus luteum	+	Yok	Yok
Granüloza hücresi	-/+	-/+	-/+
Teka hücresi	-/+	-/+	-/+
Endokrin interstisyel hücreler	-/+	-/+	-/+

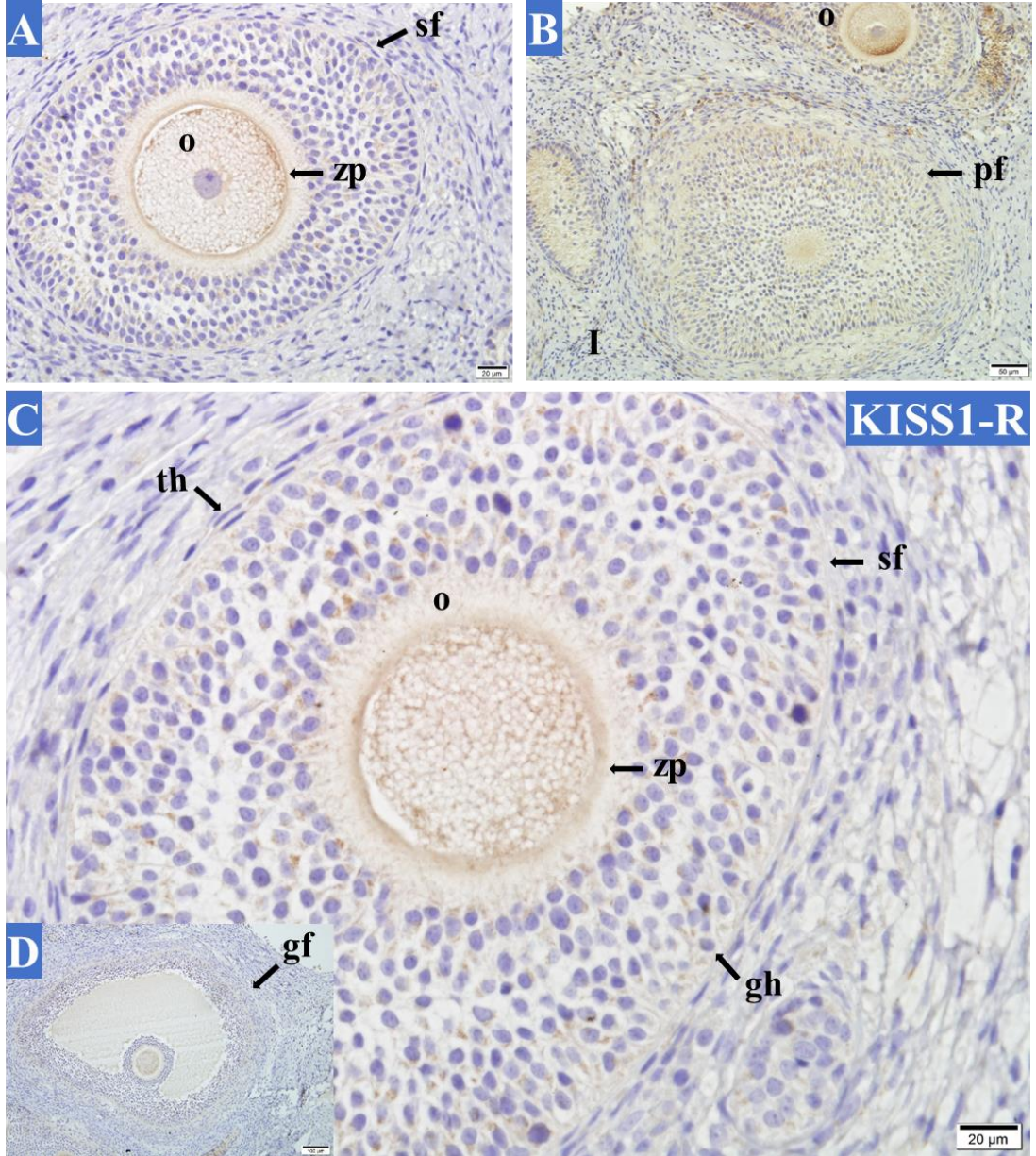
(-): immunoreaktivite yok, (+/-): zayıf, (+): güçlü, (++) : çok güçlü



Şekil 57: Östrus grup KISS1-R'nün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A: izotip kontrol (bar: 20µm-X40), B-C-D-E: KISS-R'nün ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (b,c,e- bar: 20µm-X40, d-bar: 50µm-X20), c: ovaryum üzerindeki lüteal alan, cl: corpus luteum, gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.



Şekil 58: Non-Östrus grup KISS1-R'nün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C-D: KISS-R'nün ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (bar: 20µm-X40), gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, pf: primer folikül, sf: sekonder folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.



Şekil 59: Kontrol grup KISS1-R'nün ovaryumdaki İmmünohistokimyasal lokalizasyonu; A-B-C-D: KISS-R'nün ovaryumun farklı alanlarındaki immunoreaktivitesi (a,c-bar: 20µm-X40, b-bar: 50µm-X20, d-bar: 100µm-X10), gf: graaf folikül, gh: granüloza hücresi, I: endokrin interstisyel hücreler, o: oosit, sf: sekunder folikül, pf: primer folikül, th: teka hücresi, zp: zona pelusida.

4. TARTIŞMA

Deslorelin implant uygulaması sonrasında oluşan down-regülasyon etkilenen hücrelerdeki GnRH reseptör komplekslerinin sıklığındaki azalmayı, desensitizasyon (duyarsızlaşma) ise agonistin sürekli ortamda bulunduğu durumlarda, hedef hücrelerin cevap verebilme kabiliyetindeki azalmayı ifade eder (Vickery ve Nestor 1987). Duyarsızlaşma sonucunda GnRH'nın fizyolojik pulsatil salınımı sona erer ve gonadotropin ve gonadal hormon salgılanması önlenir (Gobello 2007, Fontaine ve Fontbonne 2011). Dişi köpeklerde GnRH agonistlerinin uygulanması, hipofizi GnRH'a karşı önce uyararak bir östrus yanıtı (flare-up) oluştururken, uzun süreli salınımı sonrasında duyarsızlaştırır ve ovaryum fonksiyonunu bloke eder. Flare-up etkisi ile GnRH analoglarının uygulanmasını takip eden dönemde doğal GnRH salınımını taklit etmesi nedeniyle FSH ve LH salınımında bir artış şekillenir. Bu uygulama, izleyen dönemde östrus ve ovulasyonu uyarabilir ve gonadal supresyon 7-14 gün kadar gecikebilir (Lucas 2014).

Yetişkin köpeklerde yapılan birçok çalışmada GnRH agonistlerinin uygulanması sonrasında östrüsün uyarılması ve baskılanması sağlanmıştır. Ancak pre-pubertal dönemdeki köpeklerde GnRH nöronlarının, GnRH puls üreten nöronal devre ve nöronların salgı aktivitesini düzenleyen kontrol mekanizmasının olgunlaşmamış olması (Herbison ve Plant 2018) farklı klinik bulgularla sonuçlanmaktadır. Yapılan klinik çalışmalar farklı baskılama süreleri ve değişken flare-up bulgularının varlığını ortaya koymuştur (Trigg ve ark. 2006, Kaya ve ark. 2013, Kaya ve ark. 2015, Kaya ve ark. 2017, Schäfer-Somi ve ark. 2022). Bu sonuçlar GnRH agonisti Deslorelinin pre-pubertal uygulamalarının HPG eksenini üzerine etkilerinin tek başına GnRH salınımı ile sınırlı olmadığını ve Kisspeptin gibi pubertaya ulaşmada etkili diğer faktörlerin de araştırılması gerektiğini göstermektedir. Sunulan tez çalışması, geç prepubertal dönemdeki köpeklerde Deslorelin kullanımı ile östrusların uyarılması sonrası ve ovaryum/uterus dokularında GnRH1 ve KISS1/reseptörlerinin varlığı ve lokalizasyonunun incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Prepubertal dönem ile ilgili yapılan çalışmaların en kritik noktası kullanılacak hayvan materyalinin gerçekten bu dönemde olduğunun klinik ve hormonal analizlerle kesin olarak belirlenmesidir (Gobello 2014). Bu çalışmada kullanılan dişi köpeklerin

tamamında yapılan klinik reproduktif muayeneler, vajinal sitoloji ve E2/P4 düzeylerinin belirlenmesi ile prepubertal dönem doğrulanmıştır.

4.1. Steroit Hormon Konsantrasyonları

Puberta, seksüel olarak dimorfik olan vücut boyutu, şekli ve bileşimindeki hızlı değişiklikler ile hormonal değişikliklerin meydana geldiği dinamik bir gelişime dönemi olarak tanımlanır. Pubertanın ayırt edici özelliklerinden biri büyüme atağıdır. Meydana gelen büyüme atağının hormonal regülasyonu ve vücut kompozisyonundaki değişiklikler gonadotropinlerin, leptinin, seks steroidlerinin ve büyüme hormonunun salınmasına bağlıdır (Rogol ve ark. 2012).

Diğer memelilerde olduğu gibi dişi köpeklerde de pubertaya ulaşma yaşı farklı faktörlerden (genetik faktörler, beslenme, barınma koşulları vb.) etkilenmekle birlikte küçük ırkların cinsel olgunluğa büyük ırklardan daha erken erişmesi beklenir (Concannon 1993). Bu unsurlar prepubertal köpeklerde yapılan çalışmalara ait sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır.

Yetişkin dişi köpeklerde, serum E2 konsantrasyonu proöstrusun başlangıcında 18'den 55 pmol/L'ye yükselir ve proöstrus sırasında 147 ila 440 pmol/L'lik bir zirveye ulaşır (Concannon 2011). Kaya ve ark. (2015) prepubertal köpeklerde yaptıkları çalışmada hayvanların bazılarının çalışma süresi boyunca serum ortalama E2 konsantrasyonlarında 18'den 462 pmol/L'ye bir artış gösterdiğini, daha sonra hızla 18 pmol/L'nin altına düşerek tedavi süresince düşük kaldığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde bir başka çalışmada kontrol ve deslorelin ile tedavi edilen dişi köpeklerde dokuların alınması sırasında ortalama P4 konsantrasyonları, sırasıyla 53.79 ± 6.21 ng/ml ve 48.93 ± 6.97 ng/ml idi ($p > 0.05$). Ortalama E2 konsantrasyonları, kontrolde 6 ila 42 pg/ml (28.5 ± 7.79 pg/ml) ve deslorelin ile tedavi edilen dişi köpeklerde 6-90 pg/ml (38.73 ± 19.99 ng/ml) arasında değişmiştir ($p > 0.05$, Schäfer -Somi ve ark. 2018). Araştırmacılar, serum P4 ve E2 konsantrasyonlarındaki bu değişkenliğin olası nedenlerini, dişi köpekler arasındaki ilaç emilimi veya metabolizmasındaki bireysel farklılıklar olarak açıklamışlardır. Farklı dozda Deslorelin asetat uygulanan köpeklerde ilk dört hafta süresince bireysel deslorelin konsantrasyonlarındaki farklılıklar bu görüşü destekler.

Gontier ve ark. (2022), 4,7 mg Deslorelin asetat implant ile siklusları baskılanan 12 ila 16 haftalık prepubertal dişi köpeklerde ilk östrustaki E2 değerlerini sırasıyla $29,31 \pm 15,69$ ve $28,81 \pm 11,65$ pg/mL ve P4 değerlerini $3,47 \pm 6,12$ ng/mL ve $2,12 \pm 3,46$ ng/mL olarak bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada doku örneklerinin alındığı gün grupların ortalama serum östrojen konsantrasyonu ÖST, N-ÖST ve KONT grubunda sırasıyla 39.1 ± 5.88 pg/mL, 47.2 ± 7.15 pg/mL ve 59.1 ± 10.4 pg/mL olarak bulunmuştur. Serum P4 konsantrasyonu ÖST grubunda 4.01 ± 2.35 pg/mL ile daha yüksek bulunmuş ancak yine de köpeklerin çoğunda bireysel olarak fizyolojik değerlerin altında seyretmiştir. P4 değerleri, N-ÖST ve KONT grubunda sırasıyla 0.26 ± 0.03 pg/mL ve 0.39 ± 0.07 pg/mL olarak belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Çalışmalardaki steroid değerlerinin geniş bir aralıkta olması implantlara karşı bireysel emilim cevabı ve implant yerleştirme yaşının etkisini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Bununla birlikte sunulan çalışmada dokuların elde edildiği implant sonrası dönemde Deslorelin asetatın baskılama etkisini göstermeye başladığı bilinmektedir. Bu durumda elde edilen E2 değerlerinin düşme eğiliminde olması beklenir. Progesteron değerleri ise flare-up gözlenen köpeklerde çoğunlukla düşük seyretmiş ve bu durumun deslorelinin etkisinden çok pubertanın uyarılmasında etkili nöropeptid, hormon ve mediatörlerinin yetersiz salınımı ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür.

4.2. Uterus ve Ovaryumda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Ekspresyonu

Memelilerde GnRH ve reseptör sisteminin hipotalamus-hipofiz- ovaryum aksı ve dolayısıyla üreme işlevini düzenlemedeki iyi bilinen özelliklerine ek olarak, kanser hücreleri de dahil olmak üzere prostat, ovaryum (Cheung ve Wong 2008), plasenta (Cheung ve Wong 2008, Aguilar-Rojas ve Huerta-Reyes 2009, Schafer-Somi ve ark. 2015) ve meme (Cheung ve Wong 2008) gibi çok sayıda hipofiz dışı dokuda parakrin, otokrin ve endokrin etki gösterir. Bu sistemin ovaryumlarda steroidogenez (Sridaran ve ark. 1999a, Sridaran ve ark. 1999b) ve apoptozdaki (Sridaran ve ark 1998, Papadopoulos ve ark. 1999, Sridaran ve ark. 1999a) rolü birkaç memeli türünde gösterilmiş olmasına rağmen, evcil köpek türlerinde olası işlevlerine ilişkin hala bilgi eksikliği vardır. Köpeklerde şimdiye kadar üreme dokularında sadece bir GnRH

izoformu (GnRH-I) ve bir reseptör tipi tanımlanmış ve bunların köpek uterusu ve plasentasında ekspresyonu yakın zamanda bildirilmiştir (Schafer-Somi ve ark. 2015). Diğer memelilere benzer şekilde, köpeklerde de GnRH, merkezi olarak hareket ederek ovaryum fonksiyonunu etkileyen ve östrusu düzenleyen hem inhibe edici hem de uyarıcı tepkileri modüle eder (Gobello 2007).

Kemirgenler, hamsterlar ve insanlar gibi farklı memelilerin ovaryumlarında pubertal dönemde yüksek bir kisspeptin ve KISS1R ekspresyonu olduğu daha önce bildirilmiştir (Peng ve ark. 2013, Gaytan ve ark. 2009, Nakamura ve ark. 2022). Terao ve ark. (2004), rat ovaryumunda üreme işlevindeki temel rolünü vurgulayan Kisspeptin mRNA'nın varlığını ilk kez rapor etmiştir. Yakın zamanda yapılan bir araştırma, kisspeptinin farelerde ovulasyonu ve foliküler dinamikleri kontrol ettiğini ve eksikliğinin kadınlarda ovaryum yaşlanmasından sorumlu ana faktörlerden biri olduğunu göstermiştir (Ruohonen ve ark. 2022). Memelilerde pubertanın başlangıcı, steroid hormon aracılı gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesi ve üremenin kontrolü için kisspeptin çok önemli bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir (Pinilla ve ark. 2012). Pubertal süreçte kisspeptin ya da Kisspeptin reseptörü (KISS-R) eksikliği, hayvanlarda pubertanın gerçekleşmemesi ya da gecikmesine neden olmaktadır (De Roux ve ark. 2003, D'anglemont De Tassigny ve ark. 2007). Kisspeptin ayrıca bazı türlerde ovulasyonun uyarılmasında rol oynar (Duittoz ve ark. 2021). KISS1 nöronları, KISS1'in beyinden GnRH salgılanmasını düzenlemedeki rolü önem arz etmektedir (Aparicio 2005, Priyanka ve ark. 2018). KISS1 beyin dışında ayrıca periferik üreme dokularında da (ovaryum, uterus) etki göstermektedir (Maranesi ve ark. 2019, Uenoyama ve ark. 2019).

Kisspeptinlerin, GnRH bağımlı LH ve FSH salınımına neden oldukları GPR54 mutasyonlu farelerde ve sıçanlarda gösterilmiştir. Ayrıca periferik yolla verilen metastinin dişi ve erkek sıçanlarda gonadotropin düzeylerini arttırdığı ve prepubertal dişilerde ovulasyona neden olduğu, hatta bu etkinin GnRH antagonistleri ile engellenebildiği bildirilmiştir (Matsui ve ark. 2004, Navarro ve ark. 2005). Primatlarda kisspeptin uygulamasının GnRH ve LH düzeylerinde GnRH antagonistleri ile geri döndürülebilir artışa neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca yine primatlarda GPR54 mRNA seviyelerinin prepubertal dönemde, KISS1 mRNA seviyelerinin de puberta ile birlikte arttığı bilinmektedir (Shahab ve ark. 2005).

Memeli türlerinde hipotalamik kisspeptin nöronları, pubertas üzerinde ve GnRH'nın pulsatil salgısını düzenleyen nöronal ağda önemli rol üstlenerek üreme davranışlarının düzenlenmesini sağlar (Sivalingam ve Parhar 2022). Farklı memeli türlerinde Kisspeptin nöronlarının merkezi sinir sistemindeki dağılımları üzerine yapılan çalışmalar dişilerde anteroventralperiventriküler çekirdekte (AVPÇ) daha fazla oranda bulunduklarını ve testosteron verilmesi ile perinatal olarak erkeklerle aralarındaki bu farklılığın azaltılabildiğini bildirmektedir (Kauffman ve ark. 2007). AVPÇ'deki kisspeptin nöron topluluğunun dişilerde prenatal olarak gonadal steroidlerce organize edilen preovulatuvar GnRH/LH dalgasının oluşumunda rol alabileceği düşünülmektedir (Smith ve Clarke 2007).

Düvelerde yapılan çalışmalarda kısa süreli Deslorelin tedavisinin, sınıf 2 (6 ila 9 mm) ve sınıf 3 (>9 mm) folikül sayısında düşüşe neden olurken, sınıf 1 (<6 mm) folikül sayısının etkilemediğini ortaya koymuştur (Mattos ve ark. 2001). Bu sonuçlar bu türde foliküler büyümenin baskılanmasının, GnRH agonistinin ovaryumlar üzerindeki doğrudan etkisinden ziyade, azalmış gonadotropik destek ile ilgili olduğunu göstermiştir (D'Occhio ve ark. 2000). Ek olarak, sığır ovaryum dokularında GnRH veya GnRH agonistleri için hiçbir bağlanma bölgesi/reseptör tanımlanmamıştır (Gong ve ark. 1996).

Yetişkin dişi köpeklerde Deslorelin ile östrus baskılanmasının ardından, bir sonraki siklusta fertilitenin etkilenmediği bildirilmiştir (Borges ve ark. 2015). Deslorelinin prepubertal köpeklerde ovaryum fonksiyonlarının baskılanması ve ovaryum aktivitesinin yeniden başlaması üzerindeki lokal etkisi, implantın etkisi sona erdikten sonra incelenmiştir. Deslorelin ile pubertaya girişleri ertelenen ve gözlenen ilk östruslarının ardından OHE operasyonu ile dokuları alınan köpeklerin uterus dokusunda makroskobik ve mikroskobik bir değişiklik görülmemiştir (Schäfer-Somi ve ark. 2018).

Kaya ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada farklı dozlarda deslorelin uygulanan köpeklerde takip eden ilk östrus sonrası CL fonksiyonlarında rol oynayan önemli bazı faktörlerin ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, önemli luteotropik düzenleyici faktörlerin ekspresyonundaki dengesizliğe rağmen, GnRH analogu

Deslorelin tedavisi yoluyla pubertanın uzun süreli geciktirilmesinin dişi köpeklerde müteakip üreme aktivitesi ve ovaryum işlevselliği üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Hayvan sayısının azlığı çalışmanın sonuçlarının yorumlanması açısından sınırlayıcı bir faktör olarak bildirilmekle birlikte bu çalışmada köpek CL'de GnRH'nin yerel etkileri ve GnRH-R'nin ifadesi ilk kez gösterilmiştir. GnRH-R ekspresyonunu luteal varlığı ve luteal fazın başlangıcında daha yüksek düzeyde gözlenmesi, köpek CL'sinde GnRH'nin olası doğrudan endokrin düzenleyici olduğu anlamına gelmektedir.

Nöropeptit kisspeptin ve reseptörü KISS1R, pubertanın başlangıcını tetikleyerek GnRH hormonunun salgılanmasını ve ovulasyonu uyarak memelilerde üreme sürecini yönetir (Decourt ve ark. 2016).

Ovaryumda folikül, oosit ve corpus luteumda KISS1 ve KISS1R genlerinin ekspresyonu ve KISS1 ve KISS1R proteininin varlığı rat (Castellano ve ark. 2006, Peng ve ark. 2013, Fernandois ve ark. 2016), Sibirya hamsteri (Shahed ve Young 2009), tavşan (Maranesi ve ark. 2019), kedi (Tanyapanyachon ve ark. 2018), köpek (Cielesh ve ark. 2017, Kaya ve ark. 2017), keçi (Zheng ve ark. 2018), domuz (Basini ve ark. 2018) ve insan olmayan primatlar (Gaytan ve ark. 2009, Hu ve ark. 2019) gibi pek çok memeli türünde araştırılmıştır. Ratlarda, KISS1 ve KISS1R ekspresyonunun prepubertal hayvanlarda düşük olduğu ve gonadotropin tedavisine yanıt olarak foliküllerin teka hücrelerinde ve luteal dokuda ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (Castellano ve ark. 2006, Peng ve ark. 2013). Köpeklerde, prepubertal dönemde ovaryumlarda KISS1R proteininin düşük düzeydeki ekspresyonu belirlenirken KISS1 proteininin belirlenebilir düzeyde olmadığı bildirilmiştir (Cielesh ve ark. 2017, Kaya ve ark. 2017). Ratlarda, ovaryumda KISS1 ve KISS1R sabit ekspresyon gösterirken, KISS1 proteininin preovulatuvar dönemde arttığı belirlenmiş, bu artış KISS1'in ovulasyonda rol oynadığını düşündürmüştür (Castellano ve ark. 2006). Benzer şekilde, Sibirya hamsterinde, KISS1 ve KISS1R protein seviyelerinin proöstrus ve östrusta en yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir (Shahed ve Young 2009).

Yetişkin köpeklerde corpus luteumunda GnRH-R ekspresyonunun diöstrus boyunca zamana bağımlı ve luteal regresyonla birlikte azalan relatif ekspresyonu bildirilmiştir (Kaya ve ark. 2017). Sunulan tez çalışmasında köpeklerin ovaryum dokularında farklı düzeylerde olmakla birlikte tüm hedef genlerin ve reseptörlerinin

ekspresyonu saptanabilmiştir. Ancak hem GnRH hem de GnRH-R ekspresyonu düzeyleri deslorelin uygulaması sonrası ÖST ve N-ÖST ile tedavi görmeyen KONT grubunda benzerlik göstermiştir ($p>0,05$). Yetişkin köpeklerden farklı olarak deslorelin ile östrusları uyarılan köpeklerde diöstrus döneminde ovaryumlarında (bir olgu dışında) CL bulunan ÖST grubunun diğer gruplarla benzer GnRH1/GnRH-R ekspresyonu düzeyleri, Deslorelinin uzun vadede yol açtığı bildirilen luteal yetmezliğin erken diöstrustan itibaren luteal hücrelerde gen ekspresyon düzeylerini etkilendiğine dair bir gösterge olarak yorumlanabilir. Çalışmada KISS1 ve KISS-R ekspresyonu açısından ÖST grubundaki daha düşük düzeyler (sırasıyla $p<0,042$ ve $p<0,003$) deslorelin implant uygulamasının bu genler için lokal downregülasyonu hızlandırdığını düşündürmektedir. Ancak bu konuda kesin bir yargıya varabilmek için aynı dönemde steroid hormon reseptör düzeylerinin de incelendiği daha spesifik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sunulan çalışma bulguları ile paralel olarak [Kaya ve ark. \(2017\)](#) hem deslorelin ile tedavi edilen hem de kontrol grubu hayvanlarda ovaryum dokusunda, GnRH-R ve KISS1'in bağıl ifadesinin düşük bulunduğunu ve bazı örneklerde saptama limitlerinin olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada daha erken dönemde (ortalama 4,2 ay) ve farklı dozlarda (9,4 ve 4,7 mg) GnRH analogu uygulanmış olmasına rağmen Desloreline maruz kalan hayvanlarda ilk östrustaki ovaryum fonksiyonlarının uzun vadede yapılan tedaviden olumsuz etkilenmediği rapor edilmiştir. Ancak her iki çalışmanın örnekleme zamanı açısından farklılıkları sonuçların karşılaştırılabilirliğini güçleştirmektedir.

Sunulan tez çalışmasında Deslorelin implant uygulamasını takiben östrus gözlenen (ÖST) hayvanlardan alınan uterus dokusu örneklerinde GnRH1 ekspresyonu ile kontrol grubu arasında fark gözlenmezken N-ÖST grubundaki ekspresyon düzeyleri anlamlı oranda düşük bulunmuştur. Bununla birlikte hem GnRH1 hem de GnRH-R ekspresyon düzeyleri tedavi görmeyen pre-pubertal köpeklerde deslorelin uygulananlara göre daha yüksektir. Bu durum flare-up sonrası GnRH nöronlarının yaklaşık 2-3 haftalık bir agonist etkiye maruz kalmasının uygulama gruplarında hem GnRH hem de reseptöründe down-regülasyonu başlatmakta yeterli olduğunu göstermektedir. Tedavi gruplarından ÖST grubunda uyarılmış östrusa rağmen düşük düzeylerdeki P4 hormon konsantrasyonları bu bulguyu desteklemektedir.

Bu bulgulara dayanarak GnRH agonisti deslorelinin köpeklerde hipofiz seviyesinde olduğu kadar ovaryum düzeyinde de doğrudan etki gösterebileceği düşünülmektedir. GnRH agonistlerinin, ratlardakine benzer şekilde (Roth ve ark. 2001) yerel bir otoregülasyon sisteminin parçası olan ovaryum GnRH ve KISS reseptörleri aracılığıyla steroidogenezi doğrudan etkileyebileceği varsayılabilir. Bu nedenle ovaryum GnRH ve KISS protein varlığının köpeklerdeki rolü ilerleyen yıllarda daha fazla araştırma konusu olma potansiyelindedir.

Süregelen çalışmalara rağmen KISS-KISSR etkileşimlerinin moleküler yönleri, hücre içi sinyalleşme ve hücre içi biyolojisi düzeyinde gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi alanlarda önemli boşluklar vardır (Roseweir ve Millar 2008). Kisspeptin, nörokinin B ve dinorfinden (KNDy nöropeptitleri) gelen parakrin uyarıcı ve inhibe edici girdileri takiben, pulsatil GnRH salınımını kontrol etmek için doğrudan GnRH nöronlarına sinyal göndererek LH sekresyonunu ve LH atım frekansını güçlü bir şekilde uyarır (Skorupskaitė ve ark. 2014). Anteroventral periventriküler çekirdek ve preoptik alandaki kisspeptin nöronlarının sayısı dişilerde daha fazladır; bunlar, yüksek östrojen seviyesine yanıt olarak büyük miktarda kisspeptin salgılar ve preovulatar pulsatil GnRH salınımını uyarır. Dişilerde artan kisspeptin seviyesi, hipotalamusunda artan sayıda kisspeptin nöronu ve ovaryumlarda ve yağ dokularında daha fazla kisspeptin üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Lee ve ark. 2022). Kisspeptin GnRH'nın pulsatil salınımını artırır ve böylece reproduktif eksen harekete geçerek pubertal olgunlaşma sağlanır (Roseweir ve Millar 2008). Kisspeptinlerin özellikle pubertanın başlangıcında ve hipotalamo-hipofizer-gonadal eksen regülasyonundaki söz konusu etkileri bilinmekle birlikte üremenin sinirsel kontrolü açısından açıklığa kavuşturulmayı bekleyen pek çok nokta bulunmaktadır.

Hipotalamik kisspeptin nöron topluluklarının rol dağılımlarındaki önemli bir noktanın da östrojen bağımlı GnRH ve LH salınımlarının düzenlenmesi olduğu ortaya çıkmıştır (Franceschini ve ark. 2006). ER α üzerinden yapılan çalışmalar, kemiricilerde arkuat çekirdekteki kisspeptin nöron topluluklarının GnRH salınımında negatif feed-back rolü üstlendiklerini, anteroventralperiventriküler çekirdekteki (AVPV) kisspeptin nöronlarının ise pozitif feed-back görevi yaptığını düşündürmektedir (Smith ve ark. 2006 a,b). Koyunlarda da arkuat çekirdek kaudalindeki kisspeptin nöronlarının hemen hemen tamamının ve preoptik alandakilerin yarısının değişen

yoğunluklarda ER α taşıdıkları gösterilmiştir (Smith ve ark. 2006 a). Farklı türlerde yapılan çalışmalar ile kisspeptin nöronlarının ayrıca seks steroidlerine duyarlı oldukları görülmektedir. Kastrasyon ya da overektomi ile primatlar ve kemiricilerin arkuat çekirdeklerinde kisspeptin ekspresyonu artmakta, kemiricilerde AVPV'de azalma görülmekte, koyunlarda da overektomi ile arkuat çekirdekte ekspresyon artışı izlenmektedir (Kafa ve Eyigör 2011).

Gayton ve ark. 2014 yılında fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada Kisspeptin reseptör yetersizliğinin erken dönemde ovulasyon yetersizliğine neden olduğunu; KISS-R hipomorf fareleri, ovulasyon hızında erken bir düşüş, ardından antral foliküllerin ilerleyici kaybı, oosit kaybı ve tüm preantral folikül kategorilerinde bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca KISS-R yokluğuna bağlı foliküler gelişim ve ovulasyonda başarısızlığının (uzatılmış) gonadotropin replasmanı ile tamamen düzeltilemeyeceği bildirilmiştir. Bu bulgular, kisspeptin sinyallemesinin ovaryumdaki doğrudan aktif rolüne işaret etmektedir.

Sunulan çalışmada ovaryum dokusunda hem GnRH1/GnRH-R hem de KISS1/KISS1-R ekspresyonu GnRH analogu uygulamasından etkilenmiş, Deslorelin asetat uygulamasını takiben ÖST göstermiş olan köpeklerin ovaryum dokularında KISS1 ve KISS1-R ifadesi anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamakla birlikte GnRH1/GnRH-R ekspresyonunda da benzer bulgular elde edilmiştir. Söz konusu azalma GnRH ile KISS arasındaki karşılıklı regülatör mekanizmanın geç prepubertal dönemdeki agonist uygulamalarından etkilendiğini ve her iki peptidin down regüle olduğunu açıkça göstermektedir. Deslorelin implant uygulanan gruplara oranla kontrol grubundaki KISS-R ekspresyon seviyesinin daha yüksek olması ($p<0,05$) Kisspeptinin ve reseptörünün ovaryumdaki varlığının farklı fizyolojik evrelerde birden fazla işlevden sorumlu olduğu görüşünü desteklemektedir. Down-regülasyonun özellikle flare-up şekillenen ÖST grubunda gözlenmesi, hipotalamusta kisspeptin nöronlarının seks steroidlerine duyarlılığının bir benzerinin lokal bir mekanizma ile ovaryum düzeyinde de söz konusu olabileceğini düşündürmüştür.

Araştırma sonuçları Kisspeptin ve GnRH nöronal sinyalizasyon sistemleri arasında bir dereceye kadar geliş güzel ve çapraz reaktiviteye işaret etmektedir. Bilindiği kadarıyla, Kisspeptinler dışında KISS1R'nin endojen ligandlarının varlığına

dair bulgu sunulmamıştır. Kisspeptinlerin KISS1R dışındaki reseptörlerinin ne yapısı ne de fizyolojik önemi şimdiye kadar belirlenmemiştir. Bu özellikler, gelecekte KISS1R/kisspeptin sistemini manipüle etmek için yeni farmakolojik yaklaşımlar oluşturulacaktır (Franssen ve Tena-Sempere 2018). Kisspeptinin, infertilite ve üreme endokrin bozukluğu tedavilerinin mevcut dayanağı olan GnRH ve GnRH analoglarının yerini alması veya bunlarla birlikte kullanılması konusunda araştırılmaya açık pek çok alan vardır. Çoğu peptitte olduğu gibi, Kisspeptinin de uygulama şekli sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle yeni yaklaşımlara ve peptit olmayan analoglarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır ve bu konudaki çalışmalar hali hazırda devam etmektedir (Mittelman-Smith ve ark. 2012, Matsui ve Asami 2014, Albers-Wolthers ve ark. 2016, Decourt ve ark. 2016). Söz konusu analogların geliştirilmesi aynı zamanda, gonadal fonksiyonun manipüle edilmesinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır (Skorupskaite ve ark. 2014).

Bu çalışmalar, kisspeptin sinyalinin rolü hakkında verimli bilgiler sağlasa da vücuttaki periferik etkisini araştırmakta sınırlı kalmıştır. Sunulan çalışma ile dişi köpeklerde uyarılmış puberta sonrası KISS1 ve KISS1-R ekspresyonunun reproduktif dokulardaki varlığı ve lokalizasyonunun ve potansiyel rolünün belirlenmesi, konularındaki sınırlı sayıdaki literatür bilgiye katkı sağlanmıştır. Bununla birlikte yapılacak potansiyel analog geliştirme çalışmaları için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

4.3. Uterus ve Ovaryumda GnRH1, GnRH-R, KISS1 ve KISS-R Lokalizasyonu

Kisspeptin hücrelerinin GnRH nöronlarının steroid negatif-feedback kontrolünde kilit rol oynadığı ve bu hücrelerde gonadal seks steroidleri için yüksek derecede ortak reseptör lokalizasyonunun olduğu görülmüştür. Kisspeptin hücrelerinin çoğu, östrojen reseptörünü (ER-alfa) (östradiolün GnRH sekresyonu üzerindeki negatif-feedback eylemlerinin sorumlu izoformu), progesteron reseptörünü (PR) ve androjen reseptörünü (AR) birlikte lokalize etmektedir (Wintermantel ve ark. 2006, Lehman ve ark. 2010). Kisspeptinin ve reseptörünün ovaryumdaki varlığının farklı fizyolojik evrelerde birden fazla işlevi yerine getirdiği düşünülmektedir. Foliküler gelişimdeki rolü ovaryumdaki KISS1'in mRNA'sı doğumdan pubertase kadar kademeli olarak artar (Ricu ve ark. 2012). Köpek ovaryumunun granüloza hücrelerinde üretilen ve/veya bu hücrelerde etkili olan kisspeptin, progesteron üretimi/salgılanması için

önemlidir. Korpus luteumda hem KISS1 hem de KISS1R'nin varlığı bu hipotezi desteklemiştir (Cielesh ve ark. 2017).

İHC kullanılarak KISS1 ve KISS1R proteininin ve in situ-hibridizasyon kullanılarak KISS1 ve KISS1R mRNA'nın lokalizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda, ağırlıklı olarak sırasıyla insan, fare ve sıçan proteinlerine ve DNA dizilerine karşı üretilen antikorlar ve PCR primerleri kullanılmıştır (Lijima ve ark. 2011). İnsanlar ve kemirgenler dışındaki türlerde karşılaştırmalı araştırmalar için kullanılan antikorların ve PCR primerlerinin farklı olması, spesifik antikorlara ulaşamaması ve farklı metodolojik yaklaşımlar ilgili çalışmalar arasındaki bazı belirgin tutarsızlıkları açıklayabilir.

Köpeklerde ovaryum ve uterus GnRH ve GnRH-R'ünde olduğu gibi KISS 1 ve reseptörü düzeyinde de sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kisspeptin ve reseptörünün hem gebe köpeklerden alınan uterus doku örneklerinde trofoblast hücrelerinde (Schäfer-Somi ve ark. 2017) hem de prepubertal köpeklerde GnRH agonisti uygulamasının ardından alınan uterus doku örneklerindeki farklı katmanlarda ekspresyonu (Schäfer-Somi ve ark. 2018) bildirilmiştir.

Marino ve ark. (2014), deslorelin asetat ile pubertanın uzun süreli baskılanması sonrasında uterus kornularının ince ve uzun ve serviksin dar olduğunu; histolojik olarak, uterus ince bir miyometriyal tabaka ve dağınık olgunlaşmamış endometriyal bezlerin bulunduğu bir endometriyumun izlendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada dişi köpekler deslorelin etkisi altındayken opere edilmiş ve oldukça kısa aralıklarla uygulanan üç implantın endometrium üzerindeki baskılayıcı etkisinin çok güçlü olduğu belirlenmiştir. Ancak söz konusu araştırmada köpekler sadece klinik, ultrasonografik ve endokrinolojik olarak izlenmiş, GnRH analogunun yerel reseptör ifadesi araştırılmamıştır. Bu alandaki sınırlı araştırmalardan birinde; Schäfer-Somi ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada prepubertal dişi köpeklerde tek seferlik implant uygulamasının ardından endometriyal bezlerin olgunlaşmasının bozulmadığını ancak uterus çapının yüksek dozda (9,4 mg) deslorelin asetat uygulanan grupta daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum yüksek dozda implantın uzun süreli baskılayıcı etkisi ile açıklanmıştır. Aynı çalışmada immunohistolojik sonuçlar, Deslorelinin doz etkisinin düşük olduğunu ortaya koyarken, GPR54 ve ER α , β söz konusu olduğunda, dişi köpeklerin opere edildiğinde hala prepubertal olup olmamasının sonuçları

etkilediğini ortaya koymuştur. KISS-R ekspresyonu (GPR54), halen puberta öncesi dönemde olan köpeklerde esas olarak yüzeysel ve derin uterus bez hücrelerinde pozitif olarak etiketlenmiş; ilk metestruslarında OHE uygulanan köpeklerdeki sonuçlar kontrollere benzer bulunmuştur.

Sunulan çalışmada uterusun morfolojik görünümü açısından deslorelin uygulanan ve kontrol grubu hayvanlara ait dokularda anormal bir bulguya rastlanmamıştır ancak ayrıntılı morfolojik analiz bu tezin kapsamı dışındadır. Yapılan immünohistokimyasal analizlerde GnRH1'in bütün gruplarda uterusun endometriyal stroması hariç tüm katmanında güçlü pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte GnRH-R immunoreaktivitesi N-ÖST ve KONT grubundaki GnRH1 ile benzerlik gösterirken ÖST grubunda Deslorelinin GnRH-R düzeyinde down-regülatörük etkisinin endometriyal katmanların tamamındaki zayıf immunoreaktivite ile sonuçlandığı dikkat çekicidir. Bu bulgu Deslorelin ile östrusu uyarılan köpeklerde endometriyumun maruz kaldığı progesteron etkisinin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. N-ÖST ve KONT grubundaki köpeklerin hala prepubertal olarak değerlendirileceği düşünüldüğünde uyarılmış östrus sonrası GnRH agonisti Desloreline verilen moleküler yanıt olarak uterusun GnRH'ya karşı reseptör düzeyinde duyarsızlaşmasının daha hızlı şekillenmesi muhtemeldir. Sunulan araştırmanın söz konusu genler ile ilgili ekspresyon düzeyleri de immunoreaktivite sonuçları ile paraleldir.

Prepubertal hayvanlarda yüksek sayıda ER α , β eksprese eden hücrelerin pubertal dönemindeki fizyolojik değişikliklerle ilişkili olduğu ve deslorelin ile pubertanın geciktirilmesine bağlı olmadığı bildirilmiştir (Schäfer-Somi ve ark. 2018). Pubertadan kısa bir süre önce hipotalamustan salgılanan kisspeptin ve GnRH darbelerindeki yavaş artışa reseptörlerin artan duyarlılığı eşlik eder. Bu dönemde merkezi sinir sistemindeki östrojen reseptörlerinin ve ek olarak östrojen için giderek daha fazla duyarlı hale gelen diğer organların reseptör düzeyinde up-regülasyonunun olduğu iyi bilinmektedir (Concannon 1993).

Bu çalışmada GnRH1'in ve reseptörünün ovaryumda bütün gruplarda güçlü/çok güçlü pozitif immunoreaktivite gösterdiği belirlenmiştir. Diğer gruplarda bulunmayan, ÖST grubunda belirlenen corpus luteum'da da (CL) pozitif immunoreaktivite görülmüştür. Bununla birlikte GnRH-R immunoreaktivitesinin N-

ÖST ve KONT grubundaki immunoreaktivitesi GnRH1 ile benzerlik gösterirken ÖST grubunda Deslorelinin down-regülatörük etkisinin endometriyal katmanların tamamındaki zayıf immunoreaktivite ile sonuçlandığı dikkat çekicidir.

[Ruohonen ve ark. \(2022\)](#) fareler üzerinde yapmış oldukları çalışmada KISS1 ve KISS1R'nin foliküllerde (granüloza, teka, oosit) ve korpus luteada ekspresyonunun, KISS1 ve KISS1R proteinlerinin varlığı ile birlikte, yerel KISS1'in ovaryum fonksiyonunda önemli otokrin ve parakrin etkilere sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir. [Cielesh ve ark. \(2017\)](#) köpeklerde yapmış oldukları çalışmada KISS1 ve reseptörünün ovaryumlardaki immünohistokimyasal lokalizasyonu belirlemek üzere, 10 hafta ile 10 yaş arasında 3 gruba ayrılan puberte öncesi (n = 5), anöstrus (n = 5) veya siklik hayvanlar (proestrus, östrus ve dioestrus; n = 14) olmak üzere 24 melez ırk köpeğin ovaryum dokusunu değerlendirmişlerdir. Bu çalışma ile köpek ovaryumunda KISS1 ve KISS1R'nin varlığı ortaya konulmuş, KISS1'in primordial foliküllerde, oositlerde, granüloza hücrelerinde ve CL'de gözlendiği, ancak tekal hücrelerde pozitif reaksiyon belirlenmediği ve lokalizasyonun siklusun aşamasına göre değiştiği bildirilmiştir. Köpeklerde, KISS1 ve KISS1R, östrus döngüsünün tüm aşamalarında oositlerde mevcut olması kisspeptinin sadece ovulasyon sırasında değil, tüm aşamalarda gerekli olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, kisspeptinin muhtemelen oosit gelişimi ve hayatta kalması üzerinde bir etkisi olduğu tahmin edilebilir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, relatif ekspresyon bulgularımızla paralel olarak ovaryum dokusunda KISS1 ve KISS1R proteinlerinin varlığını göstermektedir. Bu bulguya ek olarak KISS1 protein IHC lokalizasyonu teka ve endokrin intersitisyel hücreler dışında diğer tüm ovaryum komponentlerinde güçlü ve çok güçlü olarak reaktivite vermiştir. Bu sonuçlar [Cielesh ve ark. \(2017\)](#)'nın bulguları ile paralel olup, ovaryumda kisspeptin ekspresyonunun başlamasının pubertenin önemli bir parçası olması ve potansiyel olarak ovaryum steroidogenezi ve/veya oogenez süreçlerinde rol oynadığı düşünüldüğünde köpeklerin geç prepubertal dönemde olması ile ilişkilendirilebilir. Bu durumda ovaryumdaki KISS1 ve KISS1R dağılımında gruplar arasındaki benzerlik Deslorelinin agonistik etkisinden bağımsız olarak ovulasyonun ve folikül sağkalımının kontrolünde özellikle oositte bulunan kisspeptin sinyalinin fizyolojik rolünü işaret etmektedir. Bu bulgular geç prepubertal

dönemde kisspeptinin üreme fonksiyonlarındaki aktif rolünü göstererek sunulan tez çalışmasının hipotezini desteklemektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler dişi köpeklerde Deslorelin asetatin geç pre-pubertal dönemdeki uygulamalarının klinik yanıtlara benzer şekilde moleküler yanıtlarının da bireysel farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma Deslorelin asetatin, geç-prepubertal dönemdeki dişi köpeklerde östrusu indükleyebildiğini göstermektedir. Çalışmada kullanılan köpeklerin tamamının pre-pubertal dönemde oldukları klinik, sitolojik ve hormonal bulgularla doğrulanmış olmakla birlikte GnRH agonistine verilen klinik ve moleküler yanıtta varyasyon pubertal sürecin karmaşık ve çok faktörlü bir biyolojik süreç olduğunu ve gelecekte daha derinlemesine araştırmalara olan ihtiyacı bir kez daha göstermiştir.

- Bu doktora çalışması ile köpeklerde pubertal süreçte GnRH'nın ve Kisspeptinin rolü ve reproduktif fonksiyonların düzenlenmesindeki yerel işlevine dair yeni bulgulara ulaşılmış ve literatürde bu türe ait sınırlı bilgiye önemli katkı sağlanmıştır.
- Sunulan tez çalışmasında Deslorelin asetat uygulanan veya kontrol grubundaki köpeklerin tamamında, ovaryum ve uterus dokularında farklı düzeylerde olmakla birlikte, KISS1-KISS1R ve GnRH-GnRH-R ekspresyonu saptanabilmektedir.
- Ovaryum dokusunda KISS-R seviyesinin en yüksek kontrol grubunda bulunan köpeklerde, en düşük seviyede Deslorelin implant sonrası östrüs gösteren grupta olması köpeklerde de pubertal süreçte KISS1-KISS1R sisteminin ovaryum fonksiyonlarının düzenlemesine katıldığını göstermektedir.
- Ovaryum dokusunda GnRH ve KISS1 ve bunlara ait reseptör ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler GnRH agonisti Deslorelin asetatin prepubertal köpeklerde üreme aktivitesi ve ovaryum işlevselliği üzerindeki uzun vadeli etkisinin bireysel olarak değişebileceğini düşündürmektedir.
- Köpeklerde ÖST ve N-ÖST gruplarındaki ekspresyon farklılıkları Deslorelinin reseptör düzeyinde oluşturacağı down-regülasyonun bazı bireylerde zaman veya doz bağımlı olabileceğini göstermektedir.
- Bu çalışmanın bulgularına dayanılarak GnRH agonisti deslorelinin köpeklerde hipofiz seviyesinde olduğu kadar ovaryum düzeyinde de doğrudan etki gösterebileceği düşünülmektedir. GnRH agonistlerinin diğer bazı memeli türlerinde olduğu gibi yerel bir otoregülasyon sisteminin parçası olan ovaryum

GnRH ve KISS reseptörleri aracılığıyla steroidogenezisi doğrudan etkileyebileceği varsayılabilir. Bu nedenle ovaryum GnRH ve KISS protein varlığının köpeklerdeki rolü ilerleyen yıllarda daha fazla araştırma konusu olma potansiyelindedir.

- Gelecekte GnRH analoglarına alternatif olabilecek, KISS1R/kisspeptin sisteminin manipüle edilmesine dayanan yeni farmakolojik yaklaşımlar oluşturulması ve peptid olmayan analogların geliştirilmesi konusunda hali hazırda devam eden çalışmalar açısından bu çalışmanın bulguları önem taşımaktadır.



6. KAYNAKÇA

Abbara A, Jayasena CN, Christopoulos G, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, Nijher GMK, Comminos AN, Peters D, Buckley A, Ratnasabapathy R, Prague JK, Salim R, Lavery SA, Bloom SR, Szigeti M, Ashby DA, Trew GH, Dhillon WS: Efficacy of Kisspeptin-54 to Trigger Oocyte Maturation in Women at High Risk of Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS) During In Vitro Fertilization (IVF) Therapy. *J Clin Endocr*, 100(9): 3322-3331, 2015.

Aguilar-Rojas A, Huerta-Reyes M: Human gonadotropin-releasing hormone receptor-activated cellular functions and signaling pathways in extra-pituitary tissues and cancer cells. *Oncology reports*, 22(5):981-990, 2009.

Alaçam E: evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. In: alaçam e, ed. evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. Ankara, Medisan, p: 33-37, 2015.

Albers-Wolthers CHJ, De Gier J, Rutten VPMG, van Kooten PJS, Leegwater PAJ, Schaefers-Okkens AC, Kooistra HS: The effects of kisspeptin agonist canine KP-10 and kisspeptin antagonist p271 on plasma LH concentrations during different stages of the estrous cycle and anestrus in the bitch. *Theriogenology*, 86(2):589-595, 2016.

Anderson RA: Brainwork in the Ovary: Kisspeptin and BDNF Signaling Converge to Ensure Oocyte Survival. *Endocrinology*, 155(8): 2751-2753, 2014.

Andrade GM, Da Silveira JC, Perrini C, Del Collado M, Gebremedhn S, Tesfaye D, Meirelles FV, Perecin F: The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the developmental competence of bovine oocytes. *Plos one*, 12(9): e0185045, 2017.

Aparicio S: Kisspeptins and GPR54 The new biology of the mammalian GnRH axis. *Cell Metabolism*, 1(5): 293-296, 2005.

Arlt S, Spankowsky S, Heuwieser W: Follicular cysts and prolonged oestrus in a female dog after administration of a deslorelin implant. *N Z Vet J*, 59(2): 87-91, 2011.

Aspden WJ, Rao A, Rose K, Scott PT, Clarke IJ, Trigg TE, Walsh J, Michael J: Differential responses in anterior pituitary luteinizing hormone (LH) content and LH β - and α -subunit mRNA, and plasma concentrations of LH and testosterone, in bulls treated with the LH-releasing hormone agonist deslorelin. *Domest Anim.Endocrinol.* 14(6): 429-437, 1997.

Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA: Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, 136(11): 4951-4962, 1995.

Baba Y, Matsuo H, Schally AV: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun*, 44(2): 459-463, 1971.

Basini G, Grasselli F, Bussolati S, Ciccimarra R, Maranesi M, Bufalari A, Zerani M: Presence and function of kisspeptin/KISS1R system in swine ovarian follicles. *Theriogenology*, 115: 1-8, 2018.

Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, Malli R, Sharabi A, Hiden U, Graier W, Knöfeler M, Andreae F, Wagner O, Quaranta V, Desoye G: Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci*, 117(8): 1319-1328, 2004.

Biran J, Tahor M, Wircer E, Levkowitz G: Role of developmental factors in hypothalamic function. *Front Neuroanat*, 9(47), 2015.

Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS: GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neurosci*, 31(3): 322-340, 2010.

Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L: The ‘magic tail’ of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett*, 546(1): 65-72, 2003.

Borges P, Fontaine E, Maenhoudt C, Payan-Carreira R, Santos N, Leblond E, Fontaine C, Fontbonne A: Fertility in Adult Bitches Previously Treated with a 4.7 mg Subcutaneous Deslorelin Implant. *Reprod Domest Anim*, 50(6): 965-971, 2015.

Brändli S, J P, Mp K, Im R: Long-term effect of repeated deslorelin acetate treatment in bitches for reproduction control. *Theriogenology*, 173: 73-82, 2021.

Bulun SE: The physiology and pathology of the female reproductive axis. *Williams textbook of endocrinology*: 541-614, 2008.

Campbell RE, Gaidamaka G, Han S-K, Herbison AE: Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci*, 106(26): 10835-10840, 2009.

Cao Y, Li Z, Jiang W, Ling Y, Kuang H: Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery. *Reprod Biol Endocrinol*, 17(1), 2019.

Cariboni A, André V, Chauvet S, Cassatella D, Davidson K, Caramello A, Fantin A, Bouloux P, Mann F, Ruhrberg C: Dysfunctional SEMA3E signaling underlies gonadotropin-releasing hormone neuron deficiency in Kallmann syndrome. *J Clin Invest*, 125(6): 2413-2428, 2015.

Casoni F, Hutchins BI, Donohue D, Fornaro M, Condie BG, Wray S: SDF and GABA interact to regulate axophilic migration of GnRH neurons. *J Cell Sci*, 125(21): 5015-5025, 2012.

Casoni F, Malone SA, Belle M, Luzzati F, Collier F, Allet C, Hrabovszky E, Rasika S, Prevot V, Chédotal A, Giacobini P: Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Development*, 143(21): 3969-3981, 2016.

Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM: Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*, 30(1): 10-15, 2009.

Castellano JM, Gaytan M, Roa J, Vigo E, Navarro VM, Bellido C, Dieguez C, Aguilar E, SáNchez-Criado JE, Pellicer A, Pinilla L, Gaytan F, Tena-Sempere M: Expression of KiSS-1 in Rat Ovary: Putative Local Regulator of Ovulation? *Endocrinology*, 147(10): 4852-4862, 2006.

Chan YM, Broder-Fingert S, Wong KM, Seminara SB: Kisspeptin/Gpr54 independent Gonadotrophin-Releasing hormone activity in Kiss1 and Gpr54 mutant mice. *J Neuroendocrinol*, 21(12): 1015-1023, 2009.

Chastant-Maillard S, de Lesegno CV, Chebrou M, Thoumire S, Meylheuc T, Fontbonne A, Chodkiewicz M, Saint-Dizier M, Reynaud K: The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. *Reprod Fertil Dev*, 23(3): 391-402, 2011.

Check J, Brasile D, Choe J, Amui J, Wilson C: The effect of cetrorelix vs. ganirelix on pregnancy outcome using minimal gonadotropin stimulation in women with elevated day 3 serum follicle stimulating hormone levels. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 36(3): 148-149, 2009.

Cheung LWT, Wong AST: Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J* 275:5479–5495, 2008.

Chew L, Purswell B: Use of a commercial GnRH vaccination for mismating in bitches. *Clin theriogenology*, 2: 361, 2010.

Chrisp P, Goa KL: Nafarelin. *Drugs*, 39(4): 523-551, 1990.

Cieleish M, McGrath B, Scott C, Norman S, Stephen C: The localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the canine ovary during different stages of the reproductive cycle. *Reprod Domest Anim*, 52: 24-28, 2017.

Clarke IJ, Pompolo S: Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci*, 88(1-2): 29-55, 2005.

Clarkson J, Han SY, Piet R, McLennan T, Kane GM, Ng J, Porteous RW, Kim JS, Colledge WH, Iremonger KJ, Herbison AE: Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc Natl Acad Sci*, 114(47): E10216-E10223, 2017.

Clasadonte J, Prevot V: The special relationship: glia–neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat Rev Endocrinol*, 14(1): 25-44, 2018.

Concannon P, Lasley B, Vanderlip S: LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *J reprod Fertil*, 51: 41-54, 1997.

Concannon P: Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reprod Domest Anim*, 44: 3-15, 2009.

Concannon PW: Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 47:3–27, 1993.

Concannon PW: Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci*, 124(3-4): 200-210, 2011.

Conn PM: The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocr Rev*, 7(1): 3-10, 1986.

Constantin S: Physiology of the Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) Neurone: Studies from Embryonic GnRH Neurones. *J Neuroendocrinol*, 23(6): 542-553, 2011.

Corrada Y, Hermo G, Johnson C, Trigg T, Gobello C: Short-term progestin treatments prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anestrous bitches. *Theriogenology*, 65(2): 366-373, 2006.

D’Occhio MJ, Campanile G, Baruselli PS: Peripheral action of kisspeptin at reproductive tissues—role in ovarian function and embryo implantation and relevance to assisted reproductive technology in livestock: a review. *Biol Reprod*, 103(6): 1157-1170, 2020.

D'Anglemont De Tassigny X, Fagg LA, Dixon JPC, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MBL, Aparicio SAJR, Colledge WH: Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci*, 104(25): 10714-10719, 2007.

De Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E: Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci*, 100(19): 10972-10976, 2003.

Decourt C, Robert V, Anger K, Galibert M, Madinier JB, Liu X, Beltramo M: A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Sci Rep*, 6(1):1-10, 2016

Delaney A, Volochayev R, Meader B, Lee J, Almpani K, Noukelak GY, Henkind J, Chalmers L, Law JR, Williamson KA, Jacobsen CM, Buitrago TP, Perez O, Cho C-H, Kaindl A, Rauch A, Steindl K, Garcia JE, Russell BE, Prasad R, Mondal UK, Reigstad HM, Clements S, Kim S, Inoue K, Arora G, Salnikov KB, Diorio NP, Prada R, Capri Y, Morioka K, Mizota M, Zechi-Ceide RM, Kokitsu-Nakata NM, Tonello C, Vendramini-Pittoli S, Da Silva Dalben G, Balasubramanian R, Dwyer AA, Seminara SB, Crowley WF, Plummer L, Hall JE, Graham JM, Lin AE, Shaw ND: Insight Into the Ontogeny of GnRH Neurons From Patients Born Without a Nose. *J Clin Endocr*, 105(5): 1538-1551, 2020.

D'Occhio M, Fordyce G, Whyte T, Aspden W, Trigg T: Reproductive responses of cattle to GnRH agonists. *Anim Reprod Sci*, 60: 433-442, 2000.

D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G: Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*, 125: 277-284, 2019.

Dorfman MD, Garcia-Rudaz C, Alderman Z, Kerr B, Lomniczi A, Dissen GA, Castellano JM, Garcia-Galiano D, Gaytan F, Xu B, Tena-Sempere M, Ojeda SR: Loss of Ntrk2/Kiss1r Signaling in Oocytes Causes Premature Ovarian Failure. *Endocrinology*, 155(8): 3098-3111, 2014.

Dubois SL, Acosta-Martínez M, DeJoseph MR, Wolfe A, Radovick S, Boehm U, Urban JH, Levine JE: Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor α in kisspeptin neurons. *Endocrinology*, 156(3): 1111-1120, 2015.

Duittoz A, Cayla X, Fleurot R, Lehnert J, Khadra A: Gonadotrophin-releasing hormone and kisspeptin: It takes two to tango. *J Neuroendocrinol*, 2021.

Eisenegger C, Naef M, Snozzi R, Heinrichs M, Fehr E: Prejudice and truth about the effect of testosterone on human bargaining behaviour. *Nature*, 463(7279): 356-359, 2010.

EMA Summary Report: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections ema/mrl/830/02-final february, committee for veterinary medicinal products deslorelin acetate summary report, 2002.

Emons G, Schally AV: The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod*, 9(7): 1364-1379, 1994.

England GC, Heimendahl AV: BSAVA manual of canine and feline reproduction and neonatology: British Small Animal Veterinary Association; 2010.

European Medicines Agency: SCIENTIFIC DISCUSSION Suprelorin 4.7 mg implant for dogs, Reproduction is authorised provided the source is acknowledged, 2010.

Fayazi M, Calder M, Bhattacharya M, Vilos GA, Power S, Babwah AV: The pregnant mouse uterus exhibits a functional kisspeptin/KISS1R signaling system on the day of embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol*, 13(1), 2015.

Fernandois D, Na E, Cuevas F, Cruz G, Lara HE, Paredes AH: Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol*, 228(3): 161-170, 2016.

Finch AR, Caunt CJ, Armstrong SP, McArdle CA: Agonist-induced internalization and downregulation of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297(3): C591-C600, 2009.

Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickinger AG: RFamide Peptides: Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical Potential. *Pharm J*, 4(9): 1248-1280, 2011.

Fink G: Gonadotropin secretion and its control. *The physiology of reproduction*, 1: 1349-1377, 1988.

Fontaine E, Fontbonne A, editors. Use of deslorelin to control fertility in the bitch. *Proc 7th EVSSAR Congress Louvain la Neuve, Belgium* pp15-17; 2010.

Fontaine E, Fontbonne A: Clinical use of GnRH agonists in canine and feline species. *Reprod Domest Anim*, 46(2): 344-353, 2011.

Fontaine E, Mir F, Vannier F, Gérardin A, Albouy M, Navarro C, Fontbonne A: Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. *Theriogenology*, 76(8): 1561-1566, 2011.

Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A: Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*, 401:225-30, 2006.

Francis RC, Soma K, Fernald RD: Social regulation of the brain-pituitary-gonadal axis. *Proc Natl Acad Sci*, 90(16): 7794-7798, 1993.

Francis VA, Abera AB, Matjila M, Millar RP, Katz AA: Kisspeptin Regulation of Genes Involved in Cell Invasion and Angiogenesis in First Trimester Human Trophoblast Cells. *Plos one*, 9(6): e99680, 2014.

Franssen D, Tena-Sempere M: The kisspeptin receptor: A key G-protein-coupled receptor in the control of the reproductive axis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 32(2), 107-123, 2018.

Frisch RE, Revelle R: Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science*, 169(3943): 397-399, 1970.

Fürst J, Fiebiger E, Rován E, Mack D, Frick J: The effect of active immunization against gonadotropin-releasing hormone on the ultrastructure of the rat ventral prostate. *Urol Res*, 22(2): 107-113, 1994.

Garcia JP, Keen KL, Seminara SB, Terasawa E: Role of Kisspeptin and NKB in Puberty in Nonhuman Primates: Sex Differences. *Semin Reprod Med*, 37(02): 047-055, 2019.

Gaytan F, Garcia-Galiano D, Dorfman MD, Manfredi-Lozano M, Castellano JM, Dissen GA, Ojeda SR, Tena-Sempere M: Kisspeptin Receptor Haplo-insufficiency Causes Premature Ovarian Failure Despite Preserved Gonadotropin Secretion. *Endocrinology*, 155(8): 3088-3097, 2014.

Gaytán F, Gaytán M, Castellano JM, Romero M, Roa J, Aparicio B, Garrido N, Sánchez-Criado JE, Millar RP, Pellicer A, Fraser HM, Tena-Sempere M: KiSS-1 in the mammalian ovary:

distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(3): E520-E531, 2009.

Giacobini P: Shaping the Reproductive System: Role of Semaphorins in Gonadotropin-Releasing Hormone Development and Function. *Neuroendocrinology*, 102(3): 200-215, 2015.

Gianotti L, Veldhuis JD, Destefanis S, Lanfranco F, Ramunni J, Arvat E, Marzetto M, Boutignon F, Deghenghi R, Ghigo E: Suppression and recovery of LH secretion by a potent and selective GnRH-receptor antagonist peptide in healthy early follicular-phase women are mediated via selective control of LH secretory burst mass. *Clin Endocrinol*, 59(4): 526-532, 2003.

Gobello C: Effects of GnRH Antagonists vs Agonists in Domestic Carnivores, a Review. *Reprod Domest Anim*, 47: 373-376, 2012.

Gobello C: New GnRH analogs in canine reproduction. *Anim Reprod Sci*, 100(1): 1-13, 2007.

Gobello C: Prepubertal and Pubertal Canine Reproductive Studies: Conflicting Aspects. *Reprod Domest Anim*, 49(6): e70-e73, 2014.

Gong JG, Campbell BK, Bramley TA, Gutierrez CG, Peters AR, Webb R: Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod*, 55(1), 68-74, 1996.

Gontier A, Youala M, Fontaine C, Raibon E, Fournel S, Briantais P, Rigaut D: Efficacy and safety of 4.7 mg deslorelin acetate implants in suppressing oestrus cycle in prepubertal female dogs. *Animals* 12, 3504, 2022.

Goodman RL, Lehman MN: Kisspeptin Neurons from Mice to Men: Similarities and Differences. *Endocrinology*, 153(11): 5105-5118, 2012.

Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA: From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides*, 30(1): 4-9, 2009.

Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA: Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol*, 254-255: 91-96, 2006.

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA: A Role for Kisspeptins in the Regulation of Gonadotropin Secretion in the Mouse. *Endocrinology*, 145(9): 4073-4077, 2004.

Grundker C, Gunthert AR, Hellriegel M, Emons G: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist triptorelin inhibits estradiol-induced serum response element (SRE) activation and c-fos expression in human endometrial, ovarian and breast cancer cells. *Eur J Endocrinol*, 151(5): 619-628, 2004.

Grundker C, Schlotawa L, Viereck V, Emons G: Protein kinase C-independent stimulation of activator protein-1 and c-Jun N-terminal kinase activity in human endometrial cancer cells by the LHRH agonist triptorelin. *Eur J Endocrinol*, 145(5): 651-658, 2001.

Guirado J, Carranza-Valencia J, Morante J: Mammalian puberty: a fly perspective. *FEBS J*, 2022.

Hatoya S, Torii R, Wijewardana V, Kumagai D, Sugiura K, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Inaba T: Induction of fertile oestrus in bitches by an intranasal spray of gonadotrophin-releasing hormone agonist. British Medical Journal Publishing Group, 2006.

Hazum E, Cuatrecasas P, Marian J, Conn PM: Receptor-mediated internalization of fluorescent gonadotropin-releasing hormone by pituitary gonadotropes. *Proc Natl Acad Sci*, 77(11): 6692-6695, 1980.

Herbison AE, Plant TM: The GnRH neuron and its control: John Wiley & Sons, p: 1-150, 2018.

Herbison AE, Porteous R, Pape J-RM, Mora JM, Hurst PR: Gonadotropin-releasing hormone neuron requirements for puberty, ovulation and fertility. *Endocrinology*, 149(2): 597-604, 2008.

Herbison AE: A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Front Neurol*, 57: 100837, 2020.

Herbison AE: Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat Rev Endocrinol*, 12(8): 452-466, 2016.

Herbison AE: The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology*, 159(11): 3723-3736, 2018.

Herbst KL: Gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(6): 660-666, 2003.

Hidden U, Bilban M, Knöfler M, Desoye G: Kisspeptins and the placenta: Regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord*, 8(1): 31-39, 2007.

Hoff JD, LASLEY BL, Yen SS: The functional relationship between priming and releasing actions of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocr*, 49(1): 8-11, 1979.

Hoffmann B, Schuler G: Receptor blockers—general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci*, 60: 295-312, 2000.

Holst P: Canine Reproduction: The Breeder's Guide-Revised 3rd Edition: Dogwise Publishing; 2019, p: 23.

Howles CM: The place of gonadotrophin-releasing hormone antagonists in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*, 4: 64-71, 2002.

Hu KL, Zhao H, Min Z, He Y, Li T, Zhen X, Ren Y, Chang H-M, Yu Y, Li R: Increased expression of KISS1 and KISS1 receptor in human granulosa lutein cells potential pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci*, 26(11): 1429-1438, 2019.

Hu MH, Li XF, McCausland B, Li SY, Gresham R, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Sam AH, Bloom SR, Poston L, Lightman SL, Murphy KG, O'Byrne KT: Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats. *Endocrinology*, 156(7): 2619-2631, 2015.

HuChang H-M, Zhao H-C, Yu Y, Li R, Qiao J: Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. *Hum Reprod Update*, 25(3): 326-343, 2019.

Hutchins BI, Klenke U, Wray S: Calcium Release-Dependent Actin Flow in the Leading Process Mediates Axophilic Migration. *J Neurosci*, 33(28): 11361-11371, 2013.

Iijima N, Takumi K, Sawai N, Ozawa H: An immunohistochemical study on the expressional dynamics of kisspeptin neurons relevant to GnRH neurons using a newly developed anti-kisspeptin antibody. *J Mol Neurosci*, 43:146-154, 2011.

Ikegami K, Minabe S, Ieda N, Goto T, Sugimoto A, Nakamura S, Inoue N, Oishi S, Maturana A, Sanbo M: Evidence of involvement of neurone-glia/neurone-neurone communications via gap junctions in synchronised activity of KND y neurones. *J Neuroendocrinol* , 29(6), 2017.

Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA: Kisspeptin Activation of Gonadotropin Releasing Hormone Neurons and Regulation of KiSS-1 mRNA in the Male Rat. *Neuroendocrinology*, 80(4): 264-272, 2004.

Janneau J-L, Maldonado-Estrada J, Tachdjian G, Miran I, Motté N, Saulnier P, Sabourin J-C, Côté J-F, Simon B, Frydman R, Chaouat G, Bellet D: Transcriptional Expression of Genes Involved in Cell Invasion and Migration by Normal and Tumoral Trophoblast Cells. *J Clin Endocr*, 87(11): 5336-5339, 2002.

Jennings R, Premanandan C: Veterinary histology: Ohio State University; 2017.

Jiang G, Stalewski J, Galyean R, Dykert J, Schteingart C, Broqua P, Aebi A, Aubert ML, Semple G, Robson P: GnRH antagonists: a new generation of long acting analogues incorporating p-ureido-phenylalanines at positions 5 and 6. *Journal of medicinal chemistry*, 44(3): 453-467, 2001.

Johnson GL, Lapadat R: Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by erk, jnk, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600): 1911-1912, 2002.

Junaidi A, Williamson P, Martin G, Stanton P, Blackberry M, Cummins J, Trigg T: Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Dev*, 19(8): 891-898, 2007.

Jurczak A, Janowski T, Zdunczyk S, Failing K, Schuler G, Hoffmann B: Attempts to downregulate ovarian function in the bitch by applying a GnRH agonist implant in combination with a 3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase blocker; a pilot study. *Theriogenology*, 145: 176-180, 2020.

Jurczak A, Janowski T: Arterial ovarian blood flow in the periovulatory period of GnRH-induced and spontaneous estrous cycles of bitches. *Theriogenology*, 119: 131-136, 2018.

Kafa İM, Eyigör Ö: Kisspeptinler ve kisspeptin nöronları: Üreme sistemi üzerine etkileri ve hipotalamik yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 37(1):53-60, 2011.

Kalkan C , Öcal H: Köpeklerde üreme fizyolojisi. İçinde: Kaymaz M, Fındık M, Rişvanlı A, Köker A (Eds): *Kedi ve Köpeklerde Doğum ve Jinekoloji*. Medipress, Malatya s. 40-41, 2013.

Karten MJ, Rivier JE: Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev*, 7(1): 44-66, 1986.

Katt J, Duncan J, Herbon L, Barkan A, Marshall J: The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology*, 116(5): 2113-2115, 1985.

Kauffman AS, Bojkowska K, Wills A, Rissman EF: Gonadotropin-releasing hormone-ii messenger ribonucleic acid and protein content in the mammalian brain are modulated by food intake. *Endocrinology*, 147(11): 5069-5077, 2006.

Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, Hohmann JG, Rissman EF: The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci*, 27(33), 8826-8835, 2007.

Kauffman AS: Emerging Functions Of Gonadotropin-Releasing Hormone II in Mammalian Physiology and Behaviour. *J Neuroendocrinol* , 16(9): 794-806, 2004.

Kaya D ve AY SS: Effect of Deslorelin on the Genital Tract in the Bitch: Mechanism of Action and Contraceptive Efficacy. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*, 3(1):17-23, 2017.

Kaya D, Karadağ MA, Demir MC, Kuru M, Schäfer-Somi S, Aslan S: Short-term clinical effects of GnRH analogue deslorelin in bitches during late prepubertal period – preliminary results. *Reprod Domest Anim*, 54(3):144-145-2019.

Kaya D, Gram A, Kowalewski M, Schäfer-Somi S, Kuru M, Boos A, Aslan S: Expression of GnRH receptor in the canine corpus luteum, and luteal function following deslorelin acetate-induced puberty delay. *Reprod Domest Anim*, 52(6): 1104-1112, 2017.

Kaya D, Schäfer-Somi S, Kurt B, Kuru M, Kaya S, Kacar C, Aksoy Ö, Aslan S: Clinical use of deslorelin implants for the long-term contraception in prepubertal bitches: effects on epiphyseal closure, body development, and time to puberty. *Theriogenology*, 83(7): 1147-1153, 2015.

Kaya D: Prepubertal Dönemdeki Köpeklerde Reprodüktif Girişimler. *Türk Veteriner Jinekoloji Derneği IX. Ulusal & III. Uluslararası Kongresi*, 24-27 mart, Antalya / Türkiye, S;39-44, 2022.

Kerr B, Garcia-Rudaz C, Dorfman M, Paredes A, Ojeda SR: NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular development in the mouse ovary. *Reproduction*, 138(1): 131-140, 2009.

Khan HL, Bhatti S, Sehole Z, Younas H, Nathaniel S, Abbas S, Kaloglu C, Ziders R, Yildiz A, Isa AM: Putative role of the kisspeptin/kiss1r system in promoting hypothalamic gnRH release, pubertal maturation, and regulation of ovulation considering the central reproductive axis. *Fertility & Reproduction*, 04(01): 36-44, 2022.

Kirilov M, Clarkson J, Liu X, Roa J, Campos P, Porteous R, Schütz G, Herbison AE: Dependence of fertility on kisspeptin–Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nat Commun*, 4(1), 2013.

Kitahashi T, Shahjahan M, Parhar IS: Hypothalamic regulation of pituitary gonadotropins. sexual plasticity and gametogenesis in fishes: Nova Science Publishers;. p. 153-182, 2013

Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden J-M, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M: the metastasis suppressor gene kiss-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan g protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, 276(37): 34631-34636, 2001.

Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R: Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci*, 103(7): 2410-2415, 2006.

Kumar TR: What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reproduction*, 130(3): 293-302, 2005.

Kutzler M, Lamb S, Volkmann D: Comparison Between Vestibular and Subcutaneous Insertion of Deslorelin Implants for Oestrus Induction in Bitches. *Reprod Domest Anim*, 44(supl2): 83-86, 2009.

Kutzler M, Wood A: Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66(3): 514-525, 2006.

Lake JI, Lange HS, O'Brien S, Sanford SE, Maney DL: Activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis differs between behavioral phenotypes in female white-throated sparrows (*Zonotrichia albicollis*). *Gen Comp Endocrinol*, 156(2): 426-433, 2008.

Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen A-T, George SR, O'Dowd BF: Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*, 446(1): 103-107, 1999.

Lee EB, Dilower I, Marsh CA, Wolfe MW, Masumi S, Upadhyaya S, Rumi MAK: Sexual Dimorphism in Kisspeptin Signaling. *Cells* 11, 1146, 2022.

Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR: KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. *JNCI*, 88(23): 1731-1737, 1996.

Lehman MN, Hileman SM, Goodman RL: Neuroanatomy of the Kisspeptin Signaling System in Mammals: Comparative and Developmental Aspects. Springer New York, p. 27-62, 2013.

Lehman MN, Merkley CM, Coolen LM, Goodman RL: Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res J*, 1364: 90-102, 2010.

Levy JK, Friary JA, Miller LA, Tucker SJ, Fagerstone KA: Long-term fertility control in female cats with GonaCon™, a GnRH immunocontraceptive. *Theriogenology*, 76(8): 1517-1525, 2011.

Liu X, Lee K, Herbison AE: Kisspeptin Excites Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons through a Phospholipase C/Calcium-Dependent Pathway Regulating Multiple Ion Channels. *Endocrinology*, 149(9): 4605-4614, 2008.

Lopate C: editor The estrous cycle and pregnancy in the bitch. Veterinary technicians and practice managers Proceedings of the North American Veterinary Conference, Volume 22, Orlando, Florida, USA, The North American Veterinary Conference, 2008.

Lopez-Rodriguez D, Franssen D, Bakker J, Lomniczi A, Parent A-S: Cellular and molecular features of EDC exposure: consequences for the GnRH network. *Nat Rev Endocrinol*, 17(2): 83-96, 2021.

Lucas X: Clinical use of deslorelin (GnRH agonist) in companion animals: a review. *Reprod Domest Anim*, 49: 64-71, 2014.

Maenhoudt C, Santos N, Fontaine E, Mir F, Reynaud K, Navarro C, Fontbonne A: Results of GnRH agonist implants in oestrous induction and oestrous suppression in bitches and queens. *Reprod Domest Anim*, 47(s6): 393-397, 2012.

Maranesi M, Petrucci L, Leonardi L, Bufalari A, Parillo F, Boiti C, Zerani M: Kisspeptin/kisspeptin receptor system in pseudopregnant rabbit corpora lutea: presence and function. *Scientific Reports*, 9(1), 2019.

Marino G, Rizzo S, Quartuccio M, Macri F, Pagano G, Taormina A, Cristarella S, Zanghi A: Deslorelin implants in pre-pubertal female dogs: short- and long-term effects on the genital tract. *Reprod Domest Anim*, 49(2): 297-301, 2014.

Matsuda F, Ohkura S, Magata F, Munetomo A, Chen J, Sato M, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H: Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non-rodent mammals. *J Obstet Gynaecol Res*, 45(12): 2318-2329, 2019.

Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T: Peripheral administration of metastatin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(2): 383-388, 2004.

Mattos R, Orlandi C, Williams J, Staples CR, Trigg T, Thatcher WW: Effect of an implant containing the GnRH agonist deslorelin on secretion of LH, ovarian activity and milk yield of postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 56(3), 371-386, 2001.

Meethal SV, Smith MA, Bowen RL, Atwood CS: The gonadotropin connection in Alzheimer's disease. *Endocrine*, 26(3): 317-325, 2005.

Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SAJR: Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci*, 102(5): 1761-1766, 2005.

Millar RP, Lu Z-L, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR: Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25(2): 235-275, 2004.

Millar RP, Newton CL: Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nat Rev Endocrinol*, 9(8): 451-466, 2013.

Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Lu Z-L: Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neurol*, 29(1): 17-35, 2008.

Mittelman-Smit MA, Williams H, Krajewski-Hall SJ, McMullen NT, Rance NE: Role for kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons in cutaneous vasodilatation and the estrogen modulation of body temperature. *Proc Natl Acad Sci*, 109(48):19846-1985, 2012

Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA: Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J Mol Endocrinol*, 38(2): 235-244, 2007.

Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jöchle W, Trigg TE: Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: 269-273, 2001.

Nakamura S, Uenoyama Y, Ikegami K, Dai M, Watanabe Y, Takahashi C, Hirabayashi M, Tsukamura H, Maeda KI: Neonatal Kisspeptin is Steroid-Independently Required for Defeminisation and Peripubertal Kisspeptin-Induced Testosterone is Required for Masculinisation of the Brain: A Behavioural Study Using Kiss1 Knockout Rats. *J Neuroendocrinol* 28, 2016.

Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M: Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat, *Endocrinology*, Volume146(4);1689–1697, 2005.

Navarro VM, Castellano JM, FernáNdez-FernáNdez R, Tovar S, Roa J, Mayen A, Nogueiras R, Vazquez MJ, Barreiro ML, Magni P, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M: Characterization of the Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54. *Endocrinology*, 146(1): 156-163, 2005.

Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, García-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK, Braun RE, Palmiter RD, Tena-Sempere M, Alreja M, Steiner RA: Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology*, 152(11): 4265-4275, 2011.

Nestor J: Development of agonistic LHRH analogs. *LHRH and Its Analogs*: Springer; p. 3-10, 1984.

Nishiguchi R, Azuma M, Yokobori E, Uchiyama M, Matsuda K: Gonadotropin-releasing hormone 2 suppresses food intake in the zebrafish, *Danio rerio*. *Front Endocrinol*, 3: 122, 2012.

Ogawa S, Parhar IS: Heterogeneity in GnRH and kisspeptin neurons and their significance in vertebrate reproductive biology. *Front Neurol*, 64: 100963, 2022.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M: Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411(6837): 613-617, 2001.

Olson P, Bowen R, Behrendt M, Olson J, Nett T: Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *American journal of veterinary research*, 45(1): 149-153, 1984.

Osugi T, Ohtaki N, Sunakawa Y, Son YL, Ohkubo M, Iigo M, Amano M, Tsutsui K: Molecular evolution of Kiss2 genes and peptides in vertebrates. *Endocrinology*, 154(11): 4270-4280, 2013.

Padula A: GnRH analogues agonists and antagonists. *Anim Reprod Sci*, 88(1-2): 115-126, 2005.

Palm J, Reichler I: Der Einsatz von Deslorelinazetat (Suprelorin®) in der Kleintiermedizin. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 154(1): 7-12, 2012.

Papadopoulos V, Dharmarajan A M, Li H, Culty M, Lemay M, Sridaran R: Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression: correlation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem Pharmacol*, 58(9): 1389-1393, 1999.

Pasquier J, Kamech N, Lafont A-G, Vaudry H, Rousseau K, Dufour S: Kisspeptin/kisspeptin receptors. *J Mol Endocrinol*, 52: T101-T117, 2014.

Payan-Carreira R, Borges P, Fontbonne A: Pursuing alternative strategies for healthier medical contraception in dogs. *Canine Medicine: Recent Topics and Advanced Research*: 139, 2016.

Peng J, Tang M, Zhang B-P, Zhang P, Zhong T, Zong T, Yang B, Kuang HB: Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. *Fertil Steril*, 99(5): 1436-1443.e1431, 2013.

Peng Jing M.D, Min Tang MD, Bao-Ping Zhang MD, Peng Zhang BS, Ting Zhong MD, Teng Zong BS, Bei Yang MD, Hai-Bin Kuang MD: Kisspeptin stimulates progesterone secretion via the Erk1/2 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat luteal cells. *Fertility and sterility*, 99(5): 1436-1443, 2013.

Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM: Kisspeptin Acts Directly and Indirectly to Increase Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Its Effects Are Modulated by Estradiol. *Endocrinology*, 149(4): 1979-1986, 2008.

Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M: Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*, 92(3): 1235-1316, 2012.

Plant TM: Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Front Neurol*, 38: 73-88, 2015.

Plant TM: The neurobiological mechanism underlying hypothalamic GnRH pulse generation: the role of kisspeptin neurons in the arcuate nucleus. *F1000Research*, 8: 982, 2020.

Ponglowhapan S: Clinical applications of GnRH agonist deslorelin in dogs and cats. *Thai J Vet Med*; 41:51-69, 2011.

Priyanka B, Kumari GA, Raju J, Shankaraiah P: Role of kisspeptin in livestock reproduction. *Pharm Innov J*, 7: 728-731, 2018.

Radovick S, Babwah AV: Regulation of pregnancy: evidence for major roles by the uterine and placental kisspeptin/KISS1R signaling systems. *Semin Reprod Med*, 37(04): 182-190, 2019.

Radovick S, Levine JE, Wolfe A: Estrogenic regulation of the GnRH neuron. *Front Endocrinol*, 3: 52, 2012.

Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM: Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Res B Dev Reprod Toxicol*, 80(3): 233-245, 2007.

Ricu MA, Ramirez VD, Paredes AH, Lara HE: Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology*, 153(10): 4966-4977, 2012.

Roa J, Navarro VM, Tena-Sempere M: Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments1. *Biol Reprod*, 85(4): 650-660, 2011.

Roa J, Tena-Sempere M: Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(9): 519-528, 2010.

Romagnoli S, Stelletta C, Milani C, Gelli D, Falomo M, Mollo A: Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. *Reprod Domest Anim*, 44: 36-39, 2009.

Rønnekleiv OK, Kelly MJ: Kisspeptin Excitation of GnRH neurons. Springer New York; p. 113-131, 2013.

Roseweir AK, Millar RP: The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update*, 15(2): 203-212, 2008.

Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, Vincenti L: Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch. *Reprod Domest Anim*, 38(6): 440-443, 2003.

Roth C, Schricker M, Lakomek M, Strege A, Heiden I, Luft H, Jarr H: Autoregulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in a female rat model. *J Endocrinol*, 169(2), 361-372, 2001.

Rubion S, Desmoulins P, Rivière-Godet E, Kinziger M, Salavert F, Rutten F, Flochlay-Sigognault A, Driancourt M: Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology*, 66(6-7): 1651-1654, 2006.

Ruohonen ST, Gaytan F, Gaudi AU, Franssen D, Ohlsson C, Poutanen M, Tena-Sempere M: Kisspeptin signaling in oocytes is compulsory for ovulation in adult mice. *FASEB J*, 33(sup1): 580.585-580.585, 2019.

Ruohonen ST, Gaytan F, Usseglio Gaudi A, Velasco I, Kukoricza K, Perdices-Lopez C, Franssen D, Guler I, Mehmood A, Elo LL, Ohlsson C, Poutanen M, Tena-Sempere M: Selective loss of kisspeptin signaling in oocytes causes progressive premature ovulatory failure. *H Repro*, 37(4): 806-821, 2022.

Savoy-Moore RT, Schwartz NB, Duncan JA, Marshall JC: Pituitary Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors During the Rat Estrous Cycle. *Science*, 209(4459): 942-944, 1980.

Schäfer-Somi S, Ay S, Kaya D, Sözmen M, Beceriklisoy H, Ağaoğlu A, Fındık M, Van Haeften T, Aslan S: Kisspeptin-10 and the G protein-coupled receptor 54 are differentially expressed in the canine pregnant uterus and trophoblast cells. *Reprod Domest Anim*, 52: 123-129, 2017.

Schäfer-Somi S, Kaya D, Gültiken N, Aslan S: Suppression of fertility in pre-pubertal dogs and cats. *Reprod Domest Anim*, 49(s2): 21-27, 2014.

Schäfer-Somi S, Kaya D, Sözmen M, Kaya S, Aslan S: Pre-pubertal treatment with a Gn RH agonist in bitches effect on the uterus and hormone receptor expression. *Reprod Domest Anim*, 53: 103-109, 2018.

Schlafer D: Diseases of the canine uterus. *Reprod Domest Anim*, 47: 318-322, 2012.

Schlafer DH, Foster RA: Female genital system. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. 3:358, 2016.

Seeburg PH, Mason AJ, Stewart TA, Nikolics K: The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. In: Clark JH, ed. *Proceedings of the 1986 Laurentian Hormone Conference*. 43. Boston: Academic Press; p. 69-98, 1987.

Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG: The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*, 349(17): 1614-1627, 2003.

Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM: Increased hypothalamic GPR54 signaling: A potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci* 102:2129-2134, 2005.

Shahed A, Young KA: Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Mol Reprod Dev* 76:444-452, 2009.

Simonneaux V: A Kiss to drive rhythms in reproduction. *European J Neurosci*, 51(1): 509-530, 2020.

Sisk CL, Foster DL: The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci*, 7(10): 1040-1047, 2004.

Sivalingam M, Parhar IS: Hypothalamic kisspeptin and kisspeptin receptors: Species variation in reproduction and reproductive behaviours. *Front Neurol*, 64: 100951, 2022.

Skorupskaite K, George JT, Anderson RA: The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Hum Reprod Update*, 20(4): 485-500, 2014.

Smith JT, Clifton DK, Steiner RA: Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*, 131(4): 623-630, 2006a.

Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*, 18:298–303, 2006b.

Smith JT: Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev*, 57(2): 288-298, 2008.

Sower SA: Landmark discoveries in elucidating the origins of the hypothalamic-pituitary system from the perspective of a basal vertebrate, sea lamprey. *Gen Comp Endocrinol*, 264: 3-15, 2018.

Sperduti S, Limoncella S, Lazzaretti C, Paradiso E, Riccetti L, Turchi S, Ferrigno I, Bertacchini J, Palumbo C, Poti F: GnRH antagonists produce differential modulation of the signaling pathways mediated by GnRH receptors. *Int J Mol Sci*, 20(22): 5548, 2019.

Sponchiado M, Gonella-Diaza AM, Rocha CC, Turco EGL, Pugliesi G, Leroy JLMR, Binelli M: The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition in vivo. *Scientific Reports*, 9(1), 2019.

Spratt DI, Crowley Jr WF: Pituitary and gonadal responsiveness is enhanced during GnRH-induced puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 254(5): E652-E657, 1988.

Sridaran R, Hisheh S, Dharmarajan, AM: Induction of apoptosis by a gonadotropin-releasing hormone agonist during early pregnancy in the rat. *Apoptosis* 3: 51–57, 1998.

Sridaran R, Lee MA, Haynes L, Srivastava RK, Ghose M, Sridaran G, Smith CJ: GnRH action on luteal steroidogenesis during pregnancy1. *Steroids*, 64(9): 618-623, 1999a.

Sridaran R, Philip G H, Li H, Culty M, Liu Z, Stocco DM, Papadopoulos V: GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J Mol Endocrinol*, 22(1): 45-54, 1999b.

Stanislaus D, Janovick JA, Brothers S, Conn PM: Regulation of Gq/11 α by the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *Molecular Endocrinology*, 11(6): 738-746, 1997.

Stanislaus D, Ponder S, Ji TH, Conn PM: Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Couples to Multiple G Proteins in Rat Gonadotrophs and in GGH3 Cells: Evidence from Palmitoylation and Overexpression of G proteins1. *Biol Reprod*, 59(3): 579-586, 1998.

Sukcharoen N: GnRH antagonists: an update. *Thai J Obstet Gynaecol* 12: 71-76, 2000.

Sung M, Armour A, Wright P: The influence of exogenous progestin on the occurrence of proestrous or estrous signs, plasma concentrations of luteinizing hormone and estradiol in deslorelin (GnRH agonist) treated anestrous bitches. *Theriogenology*, 66(6-7): 1513-1517, 2006.

Sykiotis GP, Pitteloud N, Seminara SB, Kaiser UB, Crowley WF: Deciphering genetic disease in the genomic era: the model of GnRH deficiency. *Sci Transl Med*, 2(32): 32rv32-32rv32, 2010.

Tanyapanyachon P, Amelkina O, Chatdarong K: The expression of kisspeptin and its receptor in the domestic cat ovary and uterus in different stages of the ovarian cycle. *Theriogenology*, 117: 40-48, 2018.

Tarlatzis BC, Bili H: Safety of GnRH agonists and antagonists. Expert opinion on drug safety, 3(1): 39-46, 2004.

Taylor J, Pampillo M, Bhattacharya M, Babwah AV: Kisspeptin/KISS1R signaling potentiates extravillous trophoblast adhesion to type-I collagen in a PKC- and ERK1/2-dependent manner. *Mol Reprod Dev*, 81(1): 42-54, 2014.

Tena-Sempere M: Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments and future challenges. *Mol Cell Endocrinol*, 314(2): 164-169, 2010.

Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Hattori M, Nishimura A, Ohtaki T, Shintani Y: Expression of KiSS-1, a metastasis suppressor gene, in trophoblast giant cells of the rat placenta. *Biochim Biophys Acta*, (2-3):1678, 102-110, 2004.

Terasawa E, Guerriero KA, Plant TM: Kisspeptin and Puberty in Mammals. Springer New York; 2013. p. 253-273.

Trigg T, Wright P, Armour A, Williamson P, Junaidi A, Martin G, Doyle A, Walsh J: Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, 57: 255-261, 2001.

Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-uthai T: A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, 66(6): 1507-1512, 2006.

Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL: Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol*, 10(4): 439-450, 1996.

Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H: Central mechanism controlling pubertal onset in mammals: A triggering role of kisspeptin. *Front Endocrinol*, 10: 312, 2019.

Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, Minabe S, Tomikawa J, Goto T, Ieda N, Inoue N, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H: Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of luteinising hormone release in Kiss1 knockout rats. *J Neuroendocrinol*, 27(3): 187-197, 2015.

Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI: KNDy neuron as a gatekeeper of puberty onset. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(6): 1518-1526, 2014.

Valiente C, Diaz J, Rosa D, Mattioli G, Romero GG, Gobello C: Effect of a GnRH antagonist on GnRH agonist–implanted anestrous bitches. *Theriogenology*, 72(7): 926-929, 2009.

Vickery B, McRae G, Goodpasture J, Sanders L: Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* (United Kingdom), 1989.

Vickery BH, Nestor JJ: editors. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: development and mechanism of action. *Seminars in Reproductive Endocrinology*; Copyright© 1987 by Thieme Medical Publishers, Inc, 1987.

Vickery BH: Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *J Steroid Biochem*, 23(5): 779-791, 1985.

Wang L, Guo W, Shen X, Yeo S, Long H, Wang Z, Lyu Q, Herbison AE, Kuang Y: Different dendritic domains of the GnRH neuron underlie the pulse and surge modes of GnRH secretion in female mice. *eLife*, 9, 2020.

Weckermann D, Harzmann R: Hormone therapy in prostate cancer: LHRH antagonists versus LHRH analogues. *Eur Urol*, 46(3): 279-284, 2004.

Weiss RE: Neuroendocrinology and the Neuroendocrine System. *Goldman-Cecil Medicine*. 26:1434-1439. e1433, 2020.

Whitlock KE, Postlethwait J, Ewer J: Neuroendocrinology of reproduction: Is gonadotropin-releasing hormone (GnRH) dispensable? *Front Neurol* , 53: 100738, 2019.

Wilcox J, Potter D, Moore M, Ferrande L, Kelly E: Prospective, randomized trial comparing cetrorelix acetate and ganirelix acetate in a programmed, flexible protocol for premature luteinizing hormone surge prevention in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*, 84(1): 108-117, 2005.

Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne H-J, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz G, Herbison AE: Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*, 52(2): 271-280, 2006.

Wray S, Grant P, Gainer H: Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci*, 86(20): 8132-8136, 1989.

Wu H-M, Chang H-M, Leung PCK: Gonadotropin-releasing hormone analogs: Mechanisms of action and clinical applications in female reproduction. *Front Neurol* , 60: 100876, 2021.

Wu HM, Huang HY, Soong YK, Leung PCK, Wang HS: Kisspeptin regulation of human decidual stromal cells motility via FAK–Src intracellular tyrosine kinases. *Hum Reprod*, 34(7): 1291-1301, 2019.

Xia W, Smith O, Zmora N, Xu S, Zohar Y: Comprehensive analysis of GnRH2 neuronal projections in Zebrafish. *Sci Rep*, 4(1):1-11, 2015.

Zeydabadi Nejad S, Ramezani Tehrani F, Zadeh-Vakili A: The role of kisspeptin in female reproduction. *Int J Endocrinol Metab*, 15(3): e44337-e44337, 2017.

Zheng J, Haidar S, Raza A, Zi XD, Lu JY: Comparing KISS1 and GPR54 genes between the two breeds of goats with low and high prolificacy. *Genet Mol Res*, 17:gmr16039922, 2018.