



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**UZUN VE KISA FOTOPERİYOTLARDA SCN LEZYONU VE/VEYA
PİNEALEKTOMİLİ ERKEK SURİYE HAMSTERLERİNDE
KİSSPEPTİN, GnRH, GnIH GEN EKSPRESYONU İLE LEPTİN VE
MELATONİN HORMONUNDAKİ RİTMİK DEĞİŞİKLİKLER
DOKTORA TEZİ**

EMİNE İNCİ BALKAN

Tez Danışmanı

PROF. DR. BÜLENT GÜNDÜZ

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**UZUN VE KISA FOTOPERİYOTLARDA SCN LEZYONU VE/VEYA
PİNEALEKTOMİLİ ERKEK SURİYE HAMSTERLERİNDE KİSSPEPTİN,
GnRH, GnIH GEN EKSPRESYONU İLE LEPTİN VE MELATONİN
HORMONUNDAKİ RİTMİK DEĞİŞİKLİKLER**

DOKTORA TEZİ

EMİNE İNCİ BALKAN

Tez Danışmanı

PROF. DR. BÜLENT GÜNDÜZ

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FDK-2021-3831

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Emine İnci BALKAN tarafından Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ yönetiminde hazırlanan ve **25/07/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Uzun ve Kısa Fotoperiyotlarda SCN Lezyonu ve/veya Pinealektomili Erkek Suriye Hamsterlerinde Kisspeptin, GnRH, GnIH Gen Ekspresyonu ile Leptin ve Melatonin Hormonundaki Ritmik Değişiklikler**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

(Danışman)

Prof. Dr. Murat TOSUNOĞLU

Prof. Dr. Cahit AKGÜL

Prof. Dr. Murat YURTCAN

Prof. Dr. Aylin ER

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 25/07/2023

Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

.././2023

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Emine İnci BALKAN

25/07/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, Fotonöroendokrin Laboratuvarına adım attığım ilk andan bu yana kendime güvenmemi sağlayan, desteği, anlayışı ve sağladığı tüm bilimsel olanakların yanı sıra bizler için harcadığı emeğin karşılığını ödemenin zor olduğu, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e,

Önerileriyle tez çalışmamı geliştirmeye yardımcı olan tez izleme komitesi ve jüri üyesi, sayın hocam Prof. Dr. Murat TOSUNOĞLU'na ve sayın hocam Prof. Dr. Cahit AKGÜL'e, değerli görüş ve önerileriyle tezimin son haline gelmesine yardımcı olan saygıdeğer jüri üyesi hocalarım Prof. Dr. Murat YURTCAN ve Prof. Dr. Aylin ER'e,

Değerli görüş ve önerileri ile tez kontrol aşamasında katkı sağlayan saygı değer hocam Dr. Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR'e, ihtiyaç halinde laboratuvarlarımı kullanıma izin veren sayın hocalarım Prof. Dr. Çiğdem GÜL'e ve Prof. Dr. Ersin KARABACAK'a,

Her daim örnek aldığım değerli lise biyoloji öğretmenim İlsen ŞANLI'ya, lisans öğrenciliğimden beri destek ve emeğini esirgemeyen ağabeyim bildiğim değerli hocam Doç. Dr. Bektaş SÖNMEZ'e, motivasyon ve güler yüzleri ile her daim yanımda olan, her zorluğu kolaylaştıran Çanakkale İTÜ Doğa Koleji Kampüs Müdürü sayın hocam Hıdır KILIÇ'a, Tülay ÇARKACI, Özgül GÜN, Şebnem CANKURT, Gözde ÇAVUŞOĞLU başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Varlığı ile bana güven veren canım kardeşim İpek BALKAN ile canım babam Levent BALKAN'a ve desteğini bir an olsun esirgemeyen canım annem Nur BALKAN ve amcam Bülent BALKAN'a,

Tez çalışmama YÖK 100/2000 Doktora Öncelikli Alan 'İnsan Beyni ve Nörobilim' programı ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi FDK- 2021- 3831 no'lu proje ile finansal destek olması nedeni ile sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı annem Nur BALKAN'a ithaf etmekten mutluluk duyarım; sen olmasaydın başaramazdım.

Emine İnci BALKAN
Çanakkale, Temmuz 2023

ÖZET

UZUN VE KISA FOTOPERİYOTLARDA SCN LEZYONU VE/VEYA PİNEALEKTOMİLİ ERKEK SURIYE HAMSTERLERİNDE KİSSPEPTİN, GnRH, GnIH GEN EKSPRESYONU İLE LEPTİN VE MELATONİN HORMONUNDAKİ RİTMİK DEĞİŞİKLİKLER

Emine İnci BALKAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

25/07/2023, 76

Beyin ve üreme sistemi arasında ki kompleks ilişki nöronal ve hormonal etkileşim ile kontrol edilmektedir. Özellikle fotoperiyodik hayvanlarda beynin üreme sistemini nasıl kontrol ettiği tam olarak anlaşılammıştır. Bu tez çalışmasında uzun (16L) ve kısa (8L) fotoperiyotlarda pinealektomi ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan yetişkin erkek Suriye hamsterlerinde melatonin ve leptin hormonlarının günlük ritmi ile GnRH, GnIH ve Kisspeptin gen ekspresyonları ve protein seviyeleri arasındaki ritmik ilişki incelendi. Bu amaçla her bir fotoperiyotta kontrol grubu, pinealektomi ve SCN lezyon içeren gruplar oluşturulmuştur. Deney süresince tüm hamsterler *ad libitum* olarak bakılmıştır. Hayvanların kısa fotoperiyoda uyum sağladığını belirlemek amacı ile testis ölçümü yapılmıştır. SCN lezyon yapılan hamsterlerin aritmik olduklarını belirlemek için aktivite tekerleklerine yerleştirilmiştir. 30 günlük deney sonunda günün farklı zaman dilimlerinde (ışıkların kapandığı an, gece yarısı, ışıkların açıldığı an, gün ortası) doku ve kan örnekleri alınmıştır. Dokulardan Kisspeptin, GnRH, GnIH genlerinin anlatımlarının profili RT-qPCR tekniği ile belirlenmiştir. Western Blot tekniği ile protein seviyeleri belirlenmiştir. Kan örneklerinden elde edilen serum ile melatonin ve leptin düzeyleri için ELISA analizi yapılmıştır. Serum melatonin ve leptin seviyeleri arasında ters ritmik ilişki gözlenmiştir. Karanlık fazda melatonin seviyesi yüksek leptin seviyesi ise düşük bulunmuştur. Pinealektomi ve SCN lezyon gruplarında ise bu ritmin ortadan kalktığı belirlenmiştir. Kontrol grubunun GnRH, GnIH ve Kisspeptin mRNA ifadelerinde ve protein seviyelerinde günlük ritimler gözlenmiştir. Deney gruplarında ise nöropeptitlerin mRNA ve protein seviyeleri ışığa bağlı

olarak günlük ritimler göstermekle beraber protein ifadeleri her zaman mRNA ifadelerini yansıtmmıştır. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, bulgularımız melatonin, leptin, GnRH, GnIH ve Kisspeptin arasındaki tüm ilişkilerin üreme değil metabolik olduğunu da göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Leptin, GnRH, GnIH, Kisspeptin, Gen Ekspresyonu



ABSTRACT

RHYTHMIC CHANGES IN KISSPEPTIN, GnRH, GnIH GENE EXPRESSION AND LEPTIN- MELATONIN HORMONE IN MALE SYRIAN HAMSTERS WITH SCN LESION AND/OR PINEALECTOMY IN LONG AND SHORT PHOTOPERIODS

Emine İnci BALKAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Biology

Advisor: Prof. Dr. Bülent GÜNDÜZ

25/07/2023, 76

The complex relationship between the brain and the reproductive system is controlled by neuronal and hormonal interactions. It is not fully understood how the brain controls the reproductive system, especially in photoperiodic animals. In this thesis, the rhythmic relationship between the daily rhythm of melatonin and leptin hormones and the gene expressions of GnRH, GnIH and Kisspeptin and protein secretions in adult male Syrian hamsters who underwent pinealectomy and suprachiasmatic nucleus lesion in long (16L) and short (8L) photoperiods were investigated. For this purpose, groups including control group, pinealectomy and SCN lesion were formed in each photoperiod. All hamsters were fed *ad libitum* throughout the experiment. Testis measurement was performed to determine whether the animals adapt to the short photoperiod. SCN lesioned hamsters were placed on activity wheels to determine if they were arrhythmic. At the end of the 30-day experimental period, tissue and blood samples were taken at different time periods (lights off, midnight, lights on, midday). Quantitative analysis of GnRH, GnIH, Kisspeptin and β actin genes was performed by RT- qPCR. Protein expressions were performed by Western Blot technique. Melatonin and leptin levels in serum obtained from blood samples were determined by ELISA analysis. An inverse rhythmic relationship was observed between serum melatonin and leptin levels. In the dark phase, melatonin level was high and leptin level was low. It was determined that this rhythm disappeared in the pinealectomy and SCN lesion groups. Daily rhythms were

observed in GnRH, GnIH and Kisspeptin mRNA expressions and protein oscillations. In experimental groups, although mRNA and protein levels of neuropeptides showed daily rhythms depending on light, protein expressions did not always reflect mRNA expressions. When all these results are evaluated, our findings show that all the relationships between melatonin, leptin, GnRH, GnIH and Kisspeptin are metabolic, not reproductive.

Keywords: Melatonin, Leptin, GnRH, GnIH, Kisspeptin, Gene Expression



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	1
TABLolar DİZİNİ	2
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	3
BİRİNCİ BÖLÜM GİRİŞ.....	5
1.1. Mevsimsel Ritim	5
1.2. Sirkadiyen Ritim	6
1.3. Suprakiazmatik Nukleus.....	7
1.3.1. Suprakiazmatik Nukleusa Işık Bilgisinin İletimi	8
1.3.2. Senkronize Edici Olarak Suprakiazmatik Nukleus.....	8
1.3.3. Suprakiazmatik Nukleusun Işık Bilgisini İletimi.....	9
1.4. Pineal Bez	9
1.5. Melatonin.....	10
1.6. Hipotalamus Hipofiz Gonadal Ekseni	12
1.7. GnRH Nöronları	12
1.8. RF- Amid Nöropeptitler	14
1.8.1. RFRP-3	15
1.8.2. Kisspeptin	17
1.9. Leptin	19
İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	21
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1 . Hayvan Materyali.....	27
3.2. Deney Düzenegi	27
3.3. Deneysel Prosedürler	29
3.3.1. Testis Ölçümü	29
3.3.2. Anestezi	29
3.3.3. Pinealektomi (Pineal Bezin Çıkarılması)	30
3.3.4. Suprakiazmatik nukleus (SCN) Lezyonu	30
3.3.5. Lokomotor Aktivite Ölçümü	30
3.3.6. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması	31

3.3.7. Hormon Ölçümü	31
3.4. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	31
3.4.1. Doku Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu	32
3.4.2. RNA miktarının hesaplanması	33
3.4.3. cDNA sentezi	33
3.4.4. Real Time QPCR Reaksiyonu	34
3.4.5. RT- QPCR Reaksiyonu Hazırlanışı	34
3.5. Western Blot	36
3.6. İstatistik	37
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	38
4.1. Melatonin Hormonu ve Leptin Hormonu Değerleri	38
4.2. Real Time PCR ve Western Blot Analiz Sonuçları	41
4.3. Lokomotor Aktivite	46
4.4. Tartışma	49
BEŞİNCİ BÖLÜM SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKÇA	59
EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK 1 HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AVP	Arjinin vazopressin
Cry	Cryptochrome
FSH	Folikül uyarıcı hormon
SD	Kısa gün
LH	Luteinleştirici hormon
PT	Pars tuberalis
BOS	Beyin omurilik sıvısı
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GnIH	Gonadotropin inhibe edici hormon
RT- qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
POA	Preoptik alan
NPY	Nöropeptit Y
Per	Periyod
SCN	Suprakiazmatik nukleus
LD	Uzun gün
3V	Üçüncü ventrikül
VIP	Vazoaktif intestinal peptid

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Memelilerde ve bıldırcınlarda LPXRFa peptitlerinin aminoasit dizilimleri	16
Tablo 2	Deney düzeneği	28
Tablo 3	Doku homojenizasyonu	32
Tablo 4	cDNA sentezinin hazırlanışı	33
Tablo 5	cDNA sentezi reaksiyon koşulları	33
Tablo 6	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primerler	34
Tablo 7	RT- qPCR reaksiyonu hazırlanışı	35
Tablo 8	RT- qPCR koşulları	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Nokturnal kemirgenlerde lokomotor aktivite ritmi	6
Şekil 2	SCN'nin lokalizasyonu ve nöropeptit içeriği	7
Şekil 3	Suriye hamsteri beyнинin dorsal yüzeyinin resmi	10
Şekil 4	Foto- nöro- endokrin sistem	11
Şekil 5	Erkeklerde hipotalamus- hipofiz- gonadotropik eksenini	13
Şekil 6	Kiss 1 geninin ürünleri	18
Şekil 7	Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinde melatonin (pg/mL) değerleri	38
Şekil 8	Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinde leptin (ng/mL) değerleri	39
Şekil 9	Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinde melatonin (pg/mL) değerleri	40
Şekil 10	Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinde leptin (ng/mL) değerleri	40
Şekil 11	Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B)	41
Şekil 12	Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B)	42
Şekil 13	Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B)	43
Şekil 14	Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B)	44

Şekil 15	Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B)	45
Şekil 16	Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B)	46
Şekil 17	Kontrol grubu erkek Suriye hamsterlerinin uzun fotoperiyotta (16L) lokomotor aktivitesi	46
Şekil 18	SCN lezyon grubu erkek Suriye hamsterlerinin uzun fotoperiyotta (16L) lokomotor aktivitesi	47
Şekil 19	Kontrol grubu erkek Suriye hamsterlerinin uzun fotoperiyotta (16L) lokomotor aktivitesi	47
Şekil 20	SCN lezyon grubu erkek Suriye hamsterlerinin uzun fotoperiyotta (8L) lokomotor aktivitesi	48
Şekil 21	Erkek Suriye hamsterlerine ait eşleştirilmiş testis ağırlığı grafiği	48

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Mevsimsel Ritim

Yerkürenin kendi eksenini etrafında günlük ve Güneş etrafındaki yıllık dönüşü ile eksenin 23,5° eğimli olması kutup ve ılıman bölgelerinin rüzgar, nem, sıcaklık, gün-uzunluk/ fotoperiyot gibi çevresel parametrelerinde önemli mevsimsel değişimlere neden olur.

Ilıman bölgedeki çoğu hayvan üreme stratejisi geliştirmiştir. Fare ve sıçan gibi mevsime bağlı olmadan üreyen hayvanlar yıl boyunca aktif üreme gösterir. Fotoperiyot, mevsimsel üreyen hayvanlarda eşeyssel aktiviteyi zamanlamak için kullanılan önemli bir çevresel sinyaldir (Choi, 1996; Reiter, 1980). Mevsimsel üreyen türler biyolojik işlevleri mevsimlerle senkronize etmek için bunu entegre eder ve nöro- hormonal bir sinyale dönüştürür. Bu süreçler, ışık fazının günlük süresini saptayan ve fotoperiyodik mesajı hem beyin yapılarına hem de periferik organlara sinirsel ve hormonal çıktılar yoluyla dağıtan endojen bir sirkadiyen saate bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Üremenin değişen gün uzunluğuna bağılı olmasının temel nedeni bu faktörün yıldan yıla öngörülebilir olmasıdır. Yıllık bir üreme faaliyeti döngüsü, organizmalara doğumu hayatta kalma şansının en üst düzeye çıktığı yılın belli bir zamanıyla sınırlama avantajı sağlar.

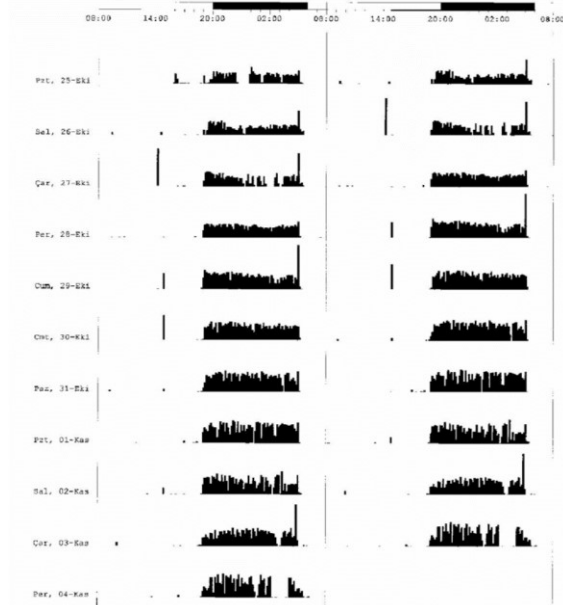
Temsili bir tür olarak hamster mevsimsel üreme modeli sergiler. Suriye hamsteri (*Mesocricetus auratus*) Cricetidae familyasına ait bir üyedir. Yıllık üreme döngüsünü yönlendiren çevresel sinyal olarak fotoperiyodu kullanır. (Gaston ve Menaker, 1967; Turek, 1975). Yıllık üreme yeteneği, ışığa duyarlı faz, daha az gün ışığının neden olduğu gonadal gerileme süreci, gonadal atrofinin meydana gelmesi sonucunda kış mevsiminde eşeyssel involüsyonunun oluşması ve fotorefrakter faz olmak üzere dört aşamadan oluşur (Choi, 1996). Gonadlar, kış mevsiminin sonundan itibaren eşeyssel aktiviteyi geri kazanmaya başlar. Bu değişiklik de endokrin sistemin kendiliğinden değişimini yansıtmaktadır. Otomatik üreme aktivitesinin kazanımına fotorefrakter faz adı verilir. Bu fazdan sonra hamsterler üreme yeteneğine sahiptir ve döngüsel fazlar yıllık olarak tekrarlanır. Suriye hamsterlerinde üreme durumunun mevsimsel değişimi yeterli kontrollü aydınlatma düzeni ile yılın hangi döneminde olursa olsun laboratuvarında yeniden sağlanabilmektedir (Stetson ve Watson-

Whitmyre, 1976). Yetişkin erkek hamsterler, uzun günde (LD, günde $\geq 12,5$ saat ışık) üreme aktivitelerini sürdürmektedir. Kısa gün (SD, $<12,5$ saat/gün ışık) ise testislerin küçülmesine sebep olmaktadır (Prendergast vd., 2000; Stetson ve Watson-Whitmyre, 1976).

1.2. Sirkadiyen Ritim

Endojen günlük ritim ilk kez mimoza bitkisi üzerinde gözlem yapan Jean- Jacques d'Ortous de Marian tarafından 1735 yılında ortaya çıkarıldı. Mimoza bitkisinin gün ışığına göre yapraklarını hareket ettirmesinin yanı sıra tamamen karanlığa maruz bırakıldığında da yaprak hareketlerinin devam ettiğini gözlemlemiştir. Bu gözlem sonucunda bitkinin endojen mekanizmaya sahip olduğu fikrinin gelişmesine neden olmuştur.

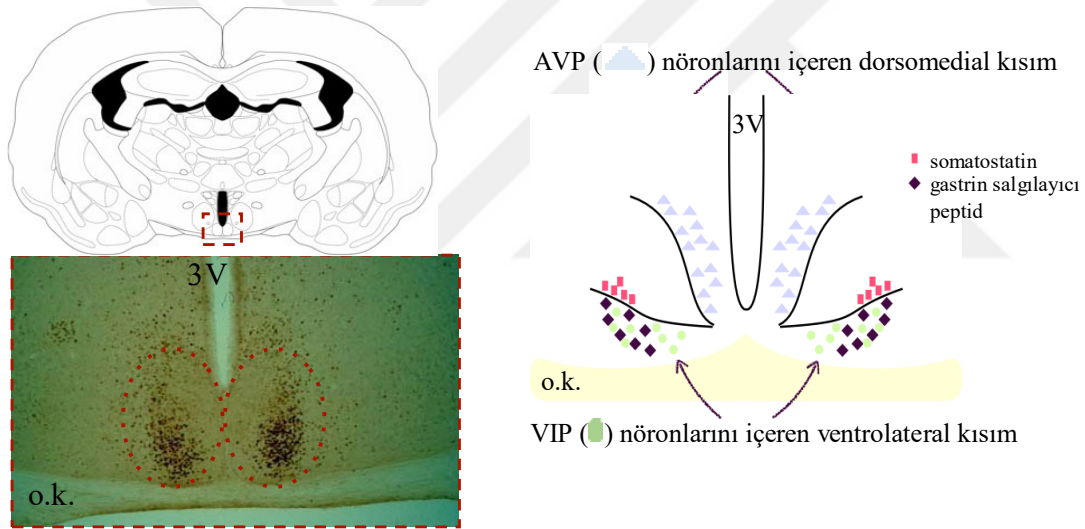
Bu günlük ritim periyodunun yaklaşık 24 saat (latince de circa= yaklaşık, dies= gün) ve endojen olması nedeni ile 'sirkadiyen' olarak adlandırılır. Siyanobakterilerden insana kadar çoğu organizmanın endojen sirkadiyen saate sahip olduğu keşfedilmiştir. En tipik örneği olarak da kemirgenlerdeki lokomotor aktivitenin günlük ritmi verilmektedir. Çoğu kemirgenler nokturnal canlılardır. Aydınlık fazda dinlenir iken karanlık fazda aktif haldedirler. Laboratuvar koşullarında, lokomotor aktivite izlenir ve nokturnal kemirgenler, aydınlık/karanlık döngüsü ile 24 saate senkronize edilmiş belirgin bir günlük lokomotor aktivite ritmi sergiler (Şekil 1).



Şekil 1. Nokturnal kemirgenlerde lokomotor aktivite ritmi.

1.3. Suprakiazmatik Nukleus

Suprakiazmatik nukleus (SCN) hipotalamusun ön kısmında, üçüncü ventrikülün her iki tarafında ve optik kiyazmanın üzerinde bulunur. Her nukleus, çoğunluğu GABAerjik (γ -aminobütirik asit) olan yaklaşık 10.000 nöronu içerir (Abrahamson ve Moore, 2001; Moore ve Speh, 1993; Moore vd., 2002). Ventrolateral ve dorsomedial olmak üzere iki kısımdan oluşur. Dorsomedial nöronlar, arjinin vazopressinin (AVP) aydınlık faz sırasında daha fazla salınım gösterdiğini sirkadiyen şekilde ifade eder (Abrahamson ve Moore, 2001; Moore vd., 2002; Tominaga vd., 1992). Ventrolateral nöronlar ise vazoaktif intestinal peptidinin (VIP) karanlık fazda daha fazla salınım yaptığını ifade eder (Abrahamson ve Moore, 2001) (Şekil 2). SCN; somatostatin, kolesistokinin, P maddesi, galanin, nörotensin ve kalretinin gibi nöropeptitleri de ifade etmektedir (Abrahamson ve Moore, 2001).



Şekil 2. SCN'nin lokalizasyonu ve nöropeptit içeriği (Ansel, 2010).

SCN, üçüncü ventrikülün (3V) her iki yanında optik kiyazmanın (o.k.) hemen üzerinde yer alır. Vazoaktif intestinal peptid (VIP) nöronları içeren bir ventrolateral kısımdan ve arjinin vazopressin (AVP) nöronları içeren bir dorsomedial kısımdan oluşur. Ventrolateral kısım ayrıca somatostatin ve gastrin salgılayıcı peptid içerir (Şekil 2).

Sirkadiyen ritimler transkripsiyonel- translasyonel geri bildirim mekanizması ile gerçekleşir. Bu geri bildirim mekanizması Clock, BMAL 1, Peryod (Per1 ve Per2), Cryptochrome (Cry1 ve Cry2) nukleus saat genleri tarafından düzenlenir (Akbay, 2020; Oike vd., 2014).

1.3.1. Suprakıyazmatik Nukleusa Işıık Bilgisinin İletimi

Sabit koşullarda, saat geni tarafından üretilen salınımların endojen periyodu yaklaşık 24 saattir. Bu salınımlar, aydınlık/karanlık döngüsü olan çevresel sinyaller (zeitgeber) (almanca; zeit=zaman, geber=vermek) tarafından 24 saate senkronize edilir. Aydınlık ve karanlık fazların ritmik değişimi, retinada doğrudan ışığa duyarlı olan ve melanopsin fotopigmentini ifade eden retinal ganglion hücre sınıfı tarafından algılanır (Hattar vd., 2002; Mrosovsky vd., 2001). Melanopsin retinal ganglion hücreleri; ışık yoğunluğundaki değişiklikleri tespit ederek pupiller çapı düzenler. Bu durum ışık refleksi olarak adlandırılır (Hattar vd., 2003). Melanopsin; “knock out” farelerde ışık bilgisi iletimini sağlar. Melanopsin ganglion hücreleri (çubuk/koni) zarar gören farelerde ise ışık iletiminin olmadığı tespit edilmiştir (Hattar vd., 2003).

Glutamat, aminoasit özellikte olan retino hipotalamik traktus yoldan iletimi sağlayan nörotransmitterdir (Ebling, 1996; Meijer ve Schwartz, 2003). Glutamat ve glutamat agonistinin sinapslara uygulanmasının nöral aktivitede faz farkı meydana getirdiği ortaya konmuştur (Mintz vd., 2002; Shirakawa ve Moore, 1994). Yanı sıra, insan ve hamster ganglion hücrelerinde hipofiz adenilat siklaz (PACAP) nörotransmitteri de yer almaktadır (Hannibal ve Fahrenkrug, 2004). Hamsterlerde yapılan çalışmalarda lateral ventrikül içerisinde PACAP enjeksiyonunun lokomotor aktivitede faz kaymasına yol açtığı tespit edilmiştir (Hannibal vd., 2004).

Genikulo hipotalamik yolda, talamusta yer alan intergenikulat yaprakçığının (IGL) retinadan ışık bilgisini alması ile SCN’ye iletimi sağlanmaktadır (Moga ve Moore, 1997; Moore vd., 2000). Genikulo hipotalamik yolda yer alan nöronların üretmiş olduğu nöropeptit Y (NPY)’nin SCN üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Stopa vd., 1999).

Rafe hücrelerinin meydana getirdiği Rafe hipotalamik yolda ise SCN’ye duyu sinirleri aracılığı ile sinyal alımı olmaktadır (Glass vd., 2003).

1.3.2. Senkronize Edici Olarak Suprakıyazmatik Nukleus

Osilatörlerin tüm vücutta dağılım gösterdiği belirlenmiştir (Hastings vd., 2003). Periferel dokularda yer alan çevresel osilatörler kendi kendilerine ritim oluşturabilmektedir

(Yoo vd., 2004). Suprakirazmatik nukleustan faz farkının olması gibi farklı özelliğe sahiptirler (Lowrey ve Takahaski, 2004).

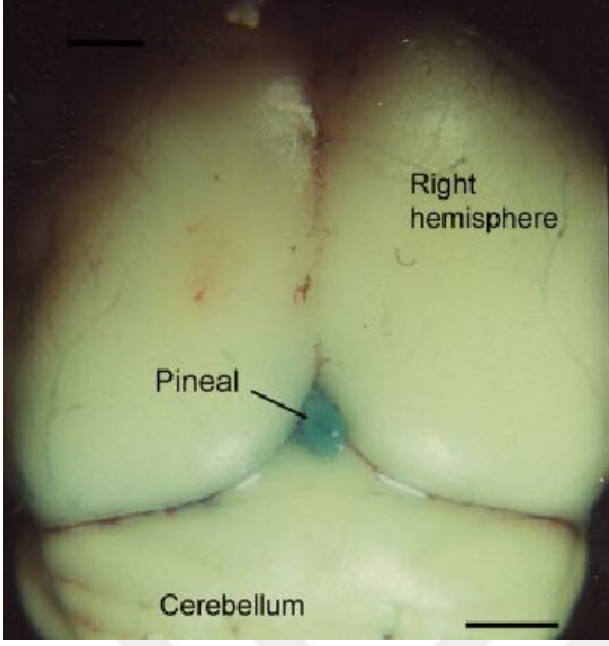
1.3.3. Suprakirazmatik Nukleusun Işık Bilgisini İletimi

SCN, fotoperiyodik bilgileri iki yoldan iletir:

- Lokomotor aktivitenin düzenlenmesinde yer alan TGF α veya prokinetikin-2 gibi yayılabilir moleküller aracılığı ile (Snodgrass-Belt vd., 2005; Zhou ve Cheng, 2005).
- Endokrin ile otonomik fonksiyonları kontrol etmek için çoklu hipotalamik beyin bölgelerine nöral bağlantılar aracılığı ile (Buijs ve Kalsbeek, 2001; Kalsbeek ve Buijs, 2002).

1.4. Pineal Bez

Pineal bez, endokrin bez olarak beyinde yer alan bir yapıdır (Erlich ve Apuzo, 1985; Kuş ve Sarsılmaz, 2002) (Şekil 3). Anterior hipotalamusa yerleşmiş SCN'den köken alan multisinaptik yoldan ileti alır. Sirkadiyen sisteme ait temel yapı olarak bilinmektedir (Wu ve Swaab, 2005). Nöroglial hücreler ve melatonin üretiminde sorumlu olan pinealositler bu yapının ana hücre tipleridir (Ross ve Pawlina, 2013; Wu ve Swaab, 2005; Yazıcı ve Köse, 2004). Üçüncü ventrikülün arka duvarı üstünde bulunan pineal bezin boyutu ve konumu türlere göre değişkenlik gösterir (Kuş ve Sarsılmaz, 2002).



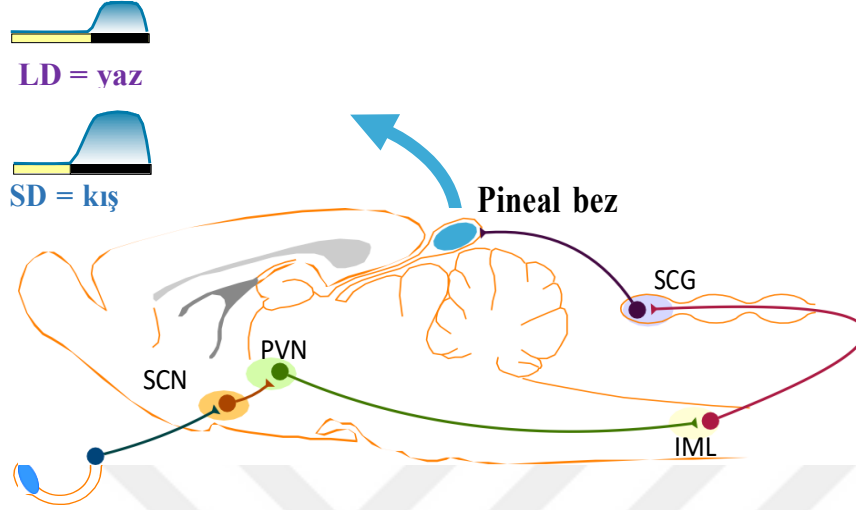
Şekil 3. Suriye hamsteri beyninin dorsal yüzeyinin resmi. Pineal bez iki serebral yarımküre arasındaki orta hatta yer alır (Rovsing ve Møller, 2014).

1.5. Melatonin

Melatonin, pineal bezden özellikle geceleri salgılanır ve karanlığın kimyasal sinyali olarak adlandırılmaktadır (Nir, 2003; Tan vd., 2013). Günün saati, hayvanın yaşı ve bazı fotoperiyodik türlerde yılın zamanı melatonin sentezi ve salınımını etkilemektedir. Ritmik bir şekilde sentezlenerek kan dolaşımına verilen hormonun seviyesi geceleri yüksek gündüzleri ise çok düşüktür (Arendt, 1988; Vilella vd., 2014). Melatonin sentezi ve salınımının sirkadiyen ritmi karanlıkta devam etmektedir. Işık, melatonin üretimini inhibe eder. Gece ışığa maruz kalınması bu ritmin değişmesine sebep olur. Pek çok fizyolojik ritim, melatoninin günlük değişimi ile senkronizedir. Diurnal türlerde gece uykusunun başlaması ve devamlılığı melatonin tarafından kontrol edilmektedir.

Işık bilgisi önce retina tarafından alınır. Alınan bilgi, retinohipotalamik yol ile SCN'ye ve paraventriküler nükleusa (PVN) aktarılır. PVN'den çıkan impuls, medulla spinalisin intermediolateral kolonundan superior servikal ganglionik (SCG) sinirler ile pineal beze ulaşmaktadır (Şekil 4). Pineal bez, SCG'den çıkan norepinefrin (NE) salgılayan postganglionik sempatik sinir liflerinden projeksiyonları alır. Pinealosit hücrelerinde NE salınımı gece meydana geldiği gibi melatonin sentezi de aynı şekilde karanlıkta meydana

gelir. Bu nedenle geceleri kandaki melatonin seviyesi gündüze göre daha yüksektir (Simonneaux ve Ribelayga, 2003). Melatonin sentezindeki artış hızı, modeli türlere ve dokulara göre değişkenlik gösterir (Acuña-Castroviejo vd., 2014; Hardeland vd., 2011).



Şekil 4. Foto- nöro- endokrin sistem (Hazlerigg ve Simonneaux, 2015).

Memelilerde, melatonin üretiminin üç ana modeli tanımlanmıştır:

- Tip A’da, melatonin gece geç saatlerde en yüksek seviyelerine ulaşır. Moğolistan gerbilleri ve Suriye hamsterlerinde görülür.
- Tip B’de, melatonin gece yarısı maksimum seviyesine ulaşır. Ginepig, sıçan ve insanda görülür.
- Tip C’ de ise gece boyunca uzun süreli melatonin seviyeleri ile bilinir. Kedi, koyun ve Sibirya hamsterlerinde görülür (Reiter, 1987).

Melatonin yarı ömrü, 20 ila 40 dakika arasındadır. Bu nedenle de kanda kısa süre kalmaktadır. Pineal bez melatonin sentezleme ve salınımına devam etmedikçe kanda seviyeleri hızla düşer. Melatonin karaciğerde 6- hidroksimelatonine enzimatik olarak parçalandıktan sonra idrar ile dışarı atılır (Panke vd., 1979; Steinlechner, 1996).

Melatoninin üreme ve endokrin sistemler üzerindeki etkilerine aracılık eden melatonin reseptörlerinin ön hipofizin pars tuberalis kısmında da yer alır (Masson-Pévet vd., 1996). Melatonin hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımını düzenler. Bu durumda melatonin gonadların işlevselliğini düzenleyerek hayvanın üreme durumunu mevsimsel olarak kontrol eder.

Melatonin, ilk defa izole edilen kurbağa derisinin koyu rengini açan sığır pineal bezinin bileşeni olarak tanımlanmıştır (Lerner vd., 1958). Daha sonra aşağı omurgalılarda pigmentasyon ve memelilerde gonadal olgunlaşma üzerindeki fizyolojik etkileri araştırılmıştır. Serebrovasküler, nöroimmunolojik, sirkediyen, üreme, uyku ve nöroendokrin gibi pek çok fizyolojik işlevi düzenlemektedir (Arendt, 2000; Borjigin vd., 1999; Brzezinski, 1997; Hardeland vd., 2006; Masana ve Dubocovich, 2001; Vanecek, 1998; Wirz-Justice, 2001).

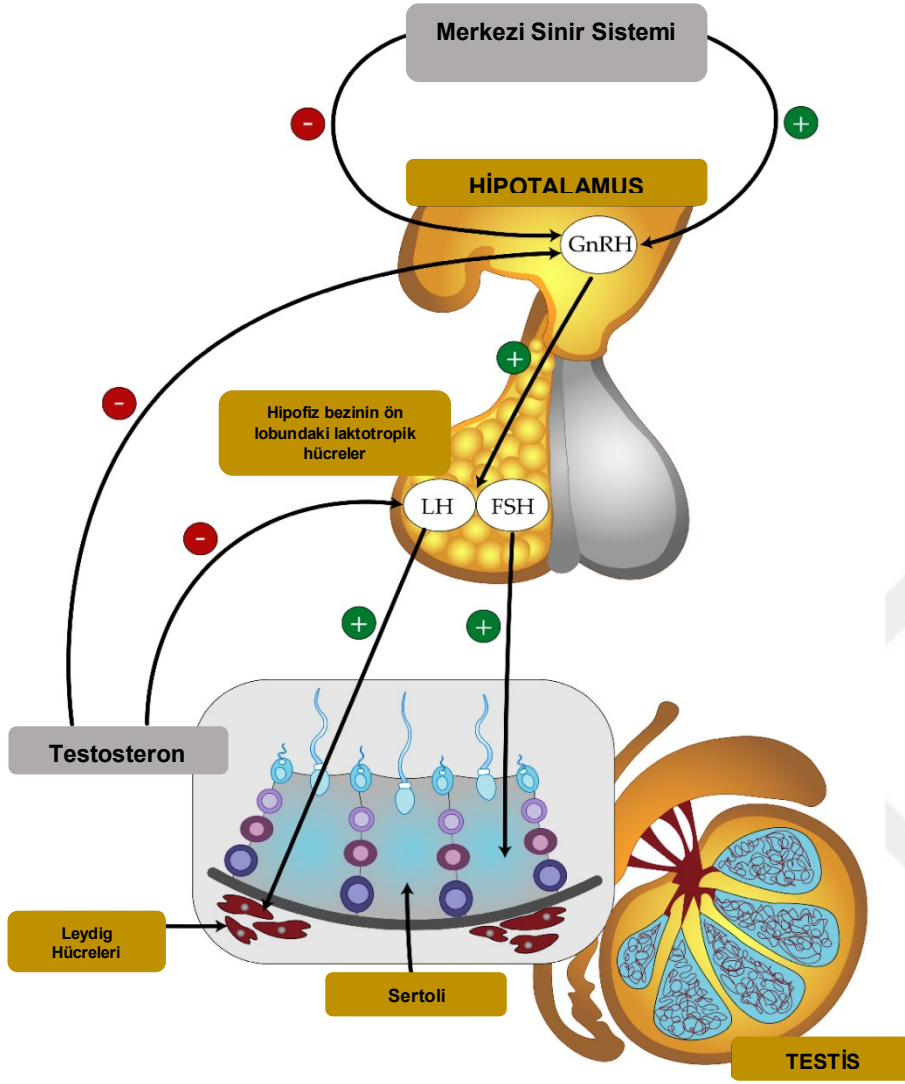
Melatoninin amfifilik özelliği herhangi bir hücreye veya vücut sıvısına girmesini sağlar (Jan vd., 2011). Fizyolojik işlevlerinin yanı sıra stres, kaygı, öğrenme ve depresyon gibi davranışsal süreçleri de etkiler (Loiseau vd., 2006).

1.6. Hipotalamus Hipofiz Gonadal Eksen

Bir türün neslinin devamlılığı için üreme davranışı gereklidir. Üreme başarısı, işlev ve eşeyssel davranışı düzenlemek için uyum içerisinde çalışan nöropeptit ve sistemine bağlıdır. Üreme davranışı, sinyallerin meydana geldiği hipotalamus, hipofiz ve gonadlar arasındaki etkileşime dayanır (Bliss vd., 2010).

1.7. GnRH Nöronları

GnRH nöronları, preoptik alanda (POA) ve lamina terminalisin organum vasculosum'u boyunca dağılım göstermektedir (Clarke ve Pompolo, 2005; Merchenthaler vd., 1984; Witkin vd., 1982; Wray ve Hoffman, 1986). GnRH, 10 aminoasitten oluşan bir decapeptit olup median eminensin dış kısmında yer alan sinir uçlarından (Hahn ve Coen, 2006) hipofiz portal sistemine pulsatil olarak salınır (Gore, 2002; Kaprara ve Huhtaniemi, 2018; Rance ve Bruce 1994). Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) sentez ve salınımını kontrol eder. Üreme işlevinin uygun şekilde sürdürülmesi için GnRH'nin pulsatil salınımı zorunludur (Bakker vd., 1999, 2010; Herbison, 2016) (Şekil 5).



Şekil 5. Erkeklerde hipotalamus-hipofiz-gonadotropik eksenini (<http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt>).

Hipotalamik GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) nöronları, hipofiz portal sistemine GnRH salgılar. GnRH, ön hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salgılanmasını tetikler. Kan dolaşımına salınan LH/FSH testisler üzerinde etki gösterir. LH, Leydig hücrelerine etki ederek testosteron salgılanmasını sağlar. FSH, spermatogenezini kontrol etmek için sertoli hücrelerine etki eder (Şekil 5).

GnRH nöronları, hücre içi sinyale ve mekanizmalara bağlı olan endojen elektriksel aktivite göstermekte ve bu aktivitelerini koordine etmektedir. GnRH pulsatil salınımının kaynağı; norepinefrin, dopamin, serotonin, GABA, glutamat, nöropeptit Y (NPY) ve galanin içeren nöronlar arasındaki karmaşık ilişkilere dayanmaktadır. Glutamat ve norepinefrin

üreme eksenini uyarırken GABA ise inhibe eder (Ojeda vd., 2006, 2010). Ayrıca, KİSS1-nörokinin B-opioid gibi diğer yolların, GnRH pulsatil salınımının düzenlenmesinde önemli işlevinin olduğu bilinmektedir (Garcia-Galiano vd., 2010; Herbison ve Moenter, 2011; Kaprara ve Huhtaniemi, 2018; Pralong, 2010; Smith ve Clarke, 2010; Qi vd., 2009).

Portal kan damarları ile ön hipofize taşınan GnRH gonadotropin üzerinde bulunan G- protein bağlı reseptörüne bağlanmaktadır. GnRH bağlanma bölgeleri ayrıca gonadlarda, plasentada, memede ve beyinde de yer almaktadır. Hipofizde GnRH reseptörü, protein kinaz C ve IP3 sistemi yoluyla hücre içi kalsiyum salınımını uyararak fosfolipaz C yolunu aktive eden bir Gq/11 proteinine bağlanır. Hipofiz portal dolaşımı sayesinde, GnRH ön hipofiz gonadotropin hücrelerine ulaşarak sistemik dolaşıma gonadotropin hormonları, luteinleştirici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını uyarır (Clarke ve Cummins, 1982; Knobil vd., 1980). Erkeklerde LH, testislerdeki Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimini uyarır ve FSH, Sertoli hücrelerinde spermatogenez başlatır. Dişilerde LH, yumurtalıkların teka hücrelerinden androjen ve östrojen üretimini uyarır ve FSH folikül büyümesini başlatır ve ovülasyonun uyarılmasına katılır. Gonadal steroid hormonları, GnRH sentezini düzenlemek ve gonadlar ile beyin arasındaki negatif geri besleme sistemi yolu ile salınımını uyararak hareket eder.

1.8. RF- Amid Nöropeptitler

GnRH, gonadotropin sentezi ve salınımında temel düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Amoss vd., 1971; Schally vd., 1971). Son yıllarda yapılan çalışmalarda GnRH'nin fizyolojik düzenlemesine katkı sağlayan yardımcı yapıların olduğu tespit edilmiştir. Japon bildircini (*Coturnix japonica*) ile yapılan çalışmada gonadotropin salınımı üzerinde ters etkiye sahip olan yeni hipotalamik nöropeptit keşfedilmiştir. Bu nöropeptide gonadotropin inhibe edici hormon (GnIH) adı verilmiştir (Tsutsui vd., 2000). Etkisini inhibitör olarak gösteren nöropeptidin insan da dahil olmak üzere diğer omurgalı canlılarda da olduğu belirlenmiştir (Chowdhury vd., 2010).

GnIH ile aynı etkiyi gösteren nöropeptidin, kanatlı hayvanlar haricindeki canlılarda RFRP-3 olduğu belirlenmiştir (Clarke vd., 2008; Sarı vd., 2009). Memeli canlı türlerinde GnIH eşdeğeri olan RF- amid ilişkili peptitler adlandırılmasının RFRP-3 olarak

kullanılmasına neden olmuştur (Clarke vd., 2008; Gibson vd., 2008). Mevsimsel üreme periyoduna sahip canlılarda GnRH ile zıt etki gösterdiği belirlenmiştir (Sarı vd., 2009).

Üreme fiziolojisi ile ilgili yapılan sonraki çalışmalarda ise GnIH'nin tersi etki gösteren yani GnRH üzerinde uyarıcı etkiye sahip olan yeni bir nöropeptit ortaya çıkmıştır. GPR54 reseptörü (Lee vd., 1999) ve devamında birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmalarda, GPR54 reseptörüne bağlanan molekülün Kiss 1 genine ait ürün olduğu tespit edilmiştir (Ohtaki vd., 2001). Bu molekül ilk olarak tümör baskılayıcı etkisi nedeni ile metastin olarak isimlendirilmiştir (Lee vd., 1996). Ancak hipogonadotropik hipogonadizmi ve puberte gecikmesi olan kişilerde GPR54 mutasyonlarının varlığının belirlenmesi ile birlikte kisspeptin olarak belirtmeye başlanmıştır (de Roux vd., 2003). Kisspeptinin etki bakımından zıt olsa da moleküler yapısı ortaya konulduğunda aminoasit dizilimi açısından GnIH ile aynı aileyi paylaştığı görülmektedir.

Memelilerde ortak bir C- terminal LPXRF amid (X=L veya Q) motifini paylaşan, kisspeptinin de üyesi olduğu peptitlerin RF amid ailesinin yeni peptitleri tanımlanmıştır. RF amid ilişkili peptit 1 ve peptit 3 (RFRP-1 ve RFRP-3) memelilerden izole edilmiştir (Hinuma vd., 2000).

1.8.1. RFRP-3

RFRP-3, C terminallerinde ortak bir Arg- Phe- NH₂ motifini paylaşan geniş RF amid peptit ailesinin bir parçasıdır. İlk olarak RF- amid peptidi, *Macrocallista nimbosa* türünde kardiyo uyarıcı etki göstermesi ile bildirilmiştir (Price ve Greenberg, 1977a). LPLRF amid tavuk beyninden izole edilerek memelilerde nöronlar üzerinde vazopresör ve uyarıcı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Barnard ve Dockray, 1984; Price ve Greenberg, 1977b). Memelilerde RFamid peptitlerini kodlayan PrRP, NPFF, QRFP/26RFa, Kp ve RFRP olmak üzere beş farklı gen tanımlanmıştır (Chartrel vd., 2003; Fukusumi vd., 2003; Hinuma vd., 1998, 2000; Jiang vd., 2003; Liu vd., 2001; Panula vd., 1999; Perry vd., 1997; Yang vd., 1985). RFRP geni, memelilerde çeşitli boyutlarda olan RFRP-1 ve RFRP-3 peptitlerini üreten öncülleri kodlar (Tablo 1) (Hinuma vd., 2000). Japon bıldırcını hipofizinden izole edilen GnIH'nin gonadotropin salınımını inhibe ettiğini göstermesi nedeni ile memelilerde nöroendokrin fonksiyonlarının düzenlenmesinde RFRP-1 ve RFRP-3 incelenmiştir.

Sıçanlarda yapılan ilk çalışmada, RFRP-1'in gonadotropin salınımı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gösterildiğinden (Hinuma vd., 2000), çalışmalar, RFRP-3'ün memeli üremesinin düzenlenmesindeki rolünü araştırmayı amaçlamıştır. Ancak, RFRP-1'in gonadotropik eksen üzerindeki etkisinin türe bağlı olabileceği yönünde de çalışmalar bulunmaktadır (Ancel vd., 2012; Ubuka vd., 2012).

Tablo 1

Memelilerde ve bildircinlarda LPXRFa (X=L veya Q) peptitlerinin aminoasit dizilimleri

*, Öncü mRNA dizilerinden varsayılan LPXRFa peptitleri.

MPHSFANLPLRFa	İnsan RFRP-1	Tsutsui vd., 2009
VPNLPQRFa	İnsan RFRP-3	Tsutsui vd., 2009
SGRNMEVSLVRQVLNLPQRFa	Maymun RFRP-3	Tsutsui vd., 2009
SLTFEEVKDWAPKIKMNKPVVNKMPPSAANLPLRFa	Sığır RFRP-1	Fukusumi vd., 2001
AMAHLPRLRGKNREDSLSRWVPNLPQRFa	Sığır RFRP-3	Fukusumi vd., 2003
SVTFQELKDWGAKKDIKMSPAPANKVPHSAANLPLRFa	Sıçan RFRP-1*	Hinuma vd., 2000
ANMEAGTMSHFPSLPQRFa	Sıçan RFRP-3	Ukena vd., 2002
SPAPANKVPHSAANLPLRFa	Sibirya hamsteri RFRP-1	Ubuka vd., 2012
TLSRVPSLPQRFa	Sibirya hamsteri RFRP-3	Ubuka vd., 2012
SPAPANKVPHSAANLPLRFa	Suriye hamsteri RFRP-1*	Kriegsfeld vd., 2006
ILSRVPSLPQRFa	Suriye hamsteri RFRP-3*	Kriegsfeld vd., 2006
SIKPSAYLPLRFa	Bıldırcın GnIH	Tsutsui vd., 2000
SLNFEEMKDWGSKNFMKVNTPTVNVKVPNSVANLPLRFa	Bıldırcın GnIH-RP-1*	Satake vd., 2001
SSIQSLLNLPQRFa	Bıldırcın GnIH-RP-2*	Satake vd., 2001

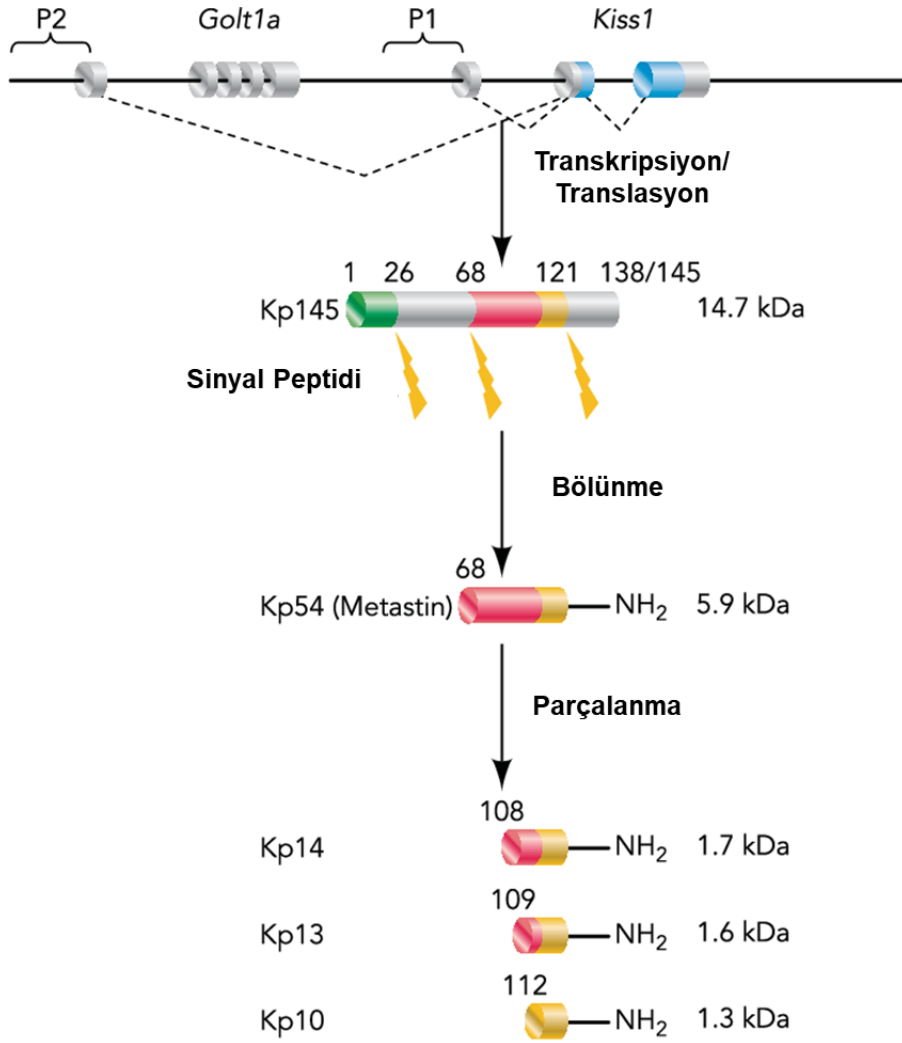
1.8.2. Kisspeptin

KİSS 1 geni, ilk olarak 1996 yılında yapılan bir çalışmada keşfedilmiştir ve kisspeptinler (Kp) adı verilen peptit ailesini kodlamaktadır (Lee vd., 1996). Kisspeptinin reseptörü GPR54 olarak bilinir iken (Lee vd., 1999), birbirinden bağımsız yapılmış olan çalışmalar ile KİSS1'in, GPR54'ün endojen bir ligandı olduğu gösterilmiştir (Ohtaki vd., 2001). GPR54, primat olmayan formlar ve primatlar için sırası ile Kiss1r veya Kiss1R olarak adlandırılmıştır (Gottsch vd., 2009). Kiss1r mutasyonlarının insanlarda ve farelerde pubertal olgunlaşmayı engellediği tespit edilmiştir. Bu durum hem fare de hem de insan da idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizmin meydana gelmesine neden olmaktadır (de Roux vd., 2003).

Kiss-1 geni, 145 amino asitlik bir propeptidi kodlamaktadır. Öncü protein proteolitik bölünme ile en bilinen formu Kiss-54'ü meydana getirmektedir (D'Occhio vd., 2020; Trevisan vd., 2018). Ana ürün olan Kiss-54 (Kp54), metastaz baskılayıcı özelliğinden dolayı metastin olarak adlandırılmıştır (Pinilla vd., 2012). Yanı sıra kisspeptin-14, kisspeptin-13 ve kisspeptin-10 amino asitlik daha kısa peptitleri de kodlamaktadır (D'Occhio vd., 2020; Trevisan vd., 2018). Kisspeptin, RF- amid peptit süper ailesine aittir. C- terminal ucu, bu peptit ailesinin ayırt edici özelliği olan arginin- fenilalanin amidatlı motiften oluşmaktadır (Şekil 6). C- terminal pozisyonundaki amid motifi, reseptör aktivasyonunda önemlidir. Kp54 yapısı düşük biyolojik aktivite göstermektedir (Ohtaki vd., 2001).

Kp54'te endojen bölünme bölgeleri tanımlanamadığından daha kısa yapıların, en uzun yapının bozunma ürünleri olabileceği düşünülmektedir (Bilban vd., 2004).

Kiss1, C-terminalinde GPR54'e bağlanmak için gerekli olan bir RF-amid motifine (insanlar, insan olmayan primatlar) veya RY-amin motifine (çiftlik hayvanları, kemirgenler) sahiptir (D'Occhio vd., 2020).



Şekil 6. Kiss 1 geninin ürünleri.

Kiss1 mRNA, Kiss1 geninden kopyalanır ve kisspeptin-145 adı verilen 145 amino asitli bir propeptit oluşturmak üzere çevrilir. Propeptit üzerinde, metastin olarak da bilinen RF-amidatlı kisspeptin-54'ün üretimine yol açan bölünme bölgeleridir. Daha kısa peptitler (kisspeptin-10, -13 ve -14 gibi) kütle spektrometresi ile belirlenmiştir. Bu peptitler, kisspeptin-54 ile ortak bir C terminalini ve RF-amidatlı motifi paylaşır. Propeptit üzerinde daha kısa peptitlerin sentezine yol açacak varsayılan bölünme bölgeleri tanımlanmadığından, bu tür peptitler, kisspeptin-54'ün bozunma ürünleri olabilir. (Popa vd., 2008).

C-terminali kemirgenlerde tirozin (Tyr), insanlarda ise fenilalanin (Phe) bulundurmasından dolayı farklılık göstermektedir (Uenoyama vd., 2018). Merkezi sinir sisteminin belirli alanlarında Kiss 1 ifade edilmektedir. Kemirgenlerde Kiss 1 mRNA, ARC'de ve anteroventral periventriküler nukleusta (AVPV) bulunmaktadır (Han vd., 2005; Mason vd., 2007; Revel vd., 2006; Smith vd., 2005). Yanı sıra, Kiss 1 pozitif nöronlar

periventriküler nukleusda, anterodorsal preoptik nukleusda ve medial amigdala gözenmektedir (Han vd., 2005). Kiss-1 mRNA ifadesi timüs, testisler, yumurtalık ve plasenta gibi periferel organlarda yüksek iken karaciğer, pankreas, ince bağırsak, dalak ve kolonda ise daha düşük seviyelerdedir (Ohtaki vd., 2001).

1.9. Leptin

Ob geninin ürünü olan leptin (167 aminoasit polipeptit), tokluk durumunda dolaşımdaki seviyeleri farelerde ve insanlarda vücut yağ içeriğini yansıtan ve enerji depolarının durumunu beyne bildiren adiposit tarafından salgılanan bir proteindir (Zhang vd., 1994). Kandaki leptin seviyeleri, yağ dokusu depolarındaki değişikliklerden bağımsız olarak aç kalma ve aşırı beslenmeye yanıt olarak değişkenlik gösterir. Enerji düzenlemedeki rolüne ek olarak, kemirgenlerde ve insanlarda aralıklı açlığa karşı nöroendokrin tepkiye aracılık etmekte, hematopoez, bağışıklık, savunma sistemi ve üreme sistemine metabolik sinyal işlevi görerek pubertenin başlangıcında görev alır (Özata vd., 2003).

Leptinin etki mekanizması hipotalamusta yer alan reseptörlerine bağlanması sonucunda gerçekleşir. Reseptörlere bağlanması ile JAK- STAT yolu başlatılır, nöropeptid Y (NPY) düzenlenir. Tip 1 sitokin reseptör ailesinde yer alan leptin reseptörünün (Lep-Ra,b,c,d,e,f) altı izoformu tanımlanmıştır (Tartaglia vd., 1995; Tartaglia, 1997).

Leptin etkisini hipotalamusta yer alan ve oreksijenik hormon olan nöropeptid Y'nin (NPY) inhibisyonu ile gösterir. NPY'nin, besin alımını uyarmasının yanı sıra GnRH salınımını baskılayıcı özelliğinin olduğu da belirlenmiştir. Leptin hem NPY'yi baskılayarak hem de KISS-1 geni ile etkileşimi sonucunda kisspeptini uyararak GnRH salınımını artırır dolaylı yoldan da pubertenin başlamasına yardım eder (Alotaibi, 2019).

Yağ dokuda gerçekleşen leptin üretimi nöroendokrin mekanizma ile kontrol edilir. Serumdaki leptin düzeyinin 24 saatlik periyot içerisinde stabil olması hipofizin pulsatil salınımının, leptin salınımında dalgalanmaya sebep olmadığını düşündürmektedir (Kiss vd., 2000).

Vücut kitle indeksi düşük olan dolayısıyla yağ oranı azalmış olan adölesan kızlarda, pubertenin daha geç başlaması yağ dokunun, puberteyi düzenleyen sinyal üretimini

sağladığını düşündürmektedir. Bu sebeple yağ dokusundan salgılanan leptin hormonu da puberte sürecinde önemlidir (Friedman ve Halaas, 1998).

Leptinin fizyolojik rolü karmaşık bir mekanizmaya sahiptir. Leptin hormonunun fazla kilo alımını önlediği bilinmekle birlikte yağ oranı düşük olan sıçanlarla yapılan çalışmada sıçanlara yapılan leptin infüzyonları sonrasında doz bağımlı olarak yağ dokunun kaybedildiği görülmüş olup leptinin vücut ağırlığı üzerinde her iki yönlü dinamik bir aktivitesinin olduğu düşünülmüştür (Friedman ve Halaas, 1998).

Açlık sürecinde; leptin seviyesi düşer ve besin alımının sağlanabilmesi için davranışsal, hormonal ve metabolik yanıtlar oluşmaya başlar. Ağırlık artışında ise plazma leptin oranı yükselir ve negatif enerji balansını sağlayan farklı bir yanıt oluşur.

Leptin reseptörleri hipotalamus dışında akciğer, karaciğer, böbrek, üreme organları ve yağ doku gibi organlar üzerinde bulunmaktadır. Leptin; yemek yeme isteğini, metabolik hızı, otonomik sinir sistemini ve vücut enerji dengesini düzenlemektedir. Santral sinir sistemi üzerindeki bu etkilerinin yanında vücudun seksüel maturasyonunun tamamlanması ve üreme yeteneğinin kazanılmasını sağlayan başlıca hormonlardan biri olan leptin, kızlarda pubertal gelişim basamaklarının ilerlemesi ve yağ dokunun artışı ile birlikte artarken erkeklerde ise kızların aksine pubertal basamakların ilerlemesi ile leptin düzeyinin düzenli bir artış içerisinde olmadığı görülmüştür. Testesteronun leptin üretimini baskılaması erkeklerdeki mevcut olan bu durumu açıklayan mekanizmalardan biri olarak düşünülmüştür (Kiess vd., 1999).

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fotoperiyodik kemirgenlerde olduğu gibi Suriye hamsterleri de gelişim ve üreme aktivitelerini gün uzunluğuna göre ayarlarlar. Kritik fotoperiyodun (12,5 saat ve üzeri) üzerinde olan tüm uzunluklarda üreme aktiftir (Elliot, 1976; Hoffman, 1982).

Horton vd. (2000), Sibiry ve Suriye hamsterlerinde uzun ve kısa fotoperiyotlarda serum leptin seviyelerinin değişimini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Sibiry hamsterlerinde kısa fotoperiyotta vücut ağırlığı ve leptin seviyesinde azalış olduğunu tespit etmişlerdir. Suriye hamsterlerinde ise fotoperiyodun zamansal dağılımında etkisi olduğunu görmüşlerdir.

Atcha vd. (2000), Sibiry hamsterleri üzerinde leptin salınımındaki mevsimsel değişikliklerin üremenin fotoperiyodik düzenlenmesine olan etkisini araştırmışlardır. Kısa gün koşullarının leptine daha duyarlı olduğunu ve bu türlerde besin alımı ve yağ kaybı üzerindeki etkilerinin farklılık gösterebileceğini ifade etmişlerdir.

Drazen vd. (2000), eksojen olarak verilen leptinin kısa gün koşullarındaki hamsterlerde uzun gün gibi tepki verdiğini belirtmişlerdir. Hem bağışıklık hem de enerjik parametreleri düzenlemek için fotoperiyoda göre farklı şekilde hareket ettiğini belirtmişlerdir.

Gün uzunluğu (ışık bigisi) üremeyi kontrol etmek amacı ile pineal bezin salgısı melatonin hormonuna dönüştürülür. Pinealektomi uzun gün üreme bilgisinin kalkmasını sağlar. Pinealektomi yapılan çayır faresi, Sibiry ve Suriye hamsterlerinde testislerin gelişmesine sebep olur (Kelly vd., 1995; Miernicki vd., 1990; Whitten vd., 1993).

Gündüz (2002), Suriye hamsterlerinde serum melatonin ve leptin düzeylerindeki günlük ritmi incelemiştir. Uzun ve kısa fotoperiyotlarda 24 saat süre boyunca 2 saatte bir kan örneklerini alarak kontrol ve deney gruplarında (pineal bezi alınan hamsterler) serum melatonin ve leptin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sirkadiyen değişimler bulmuştur. İki hormon arasındaki ilişkinin ters orantılı olduğunu belirtmiştir. Leptin seviyelerinde ritim olduğunu ve bu sonucunda melatonin veya fotoperiyoda bağlı olduğunu bildirmiştir.

Gündüz ve Stetson (2003), 50 ng melatoninin 20:00-21:00 saatleri arasında 1 saat infüze edildiğinde 16L fotoperiyodunda bulunan yetişkin erkek Sibirya hamsterlerindeki etkisini araştırmışlardır. Pineal bezleri alınmış hamsterlere 2 ay süresince 50 ng ve 500 ng dozlarında melatonin kontrol solüsyonu ile (0,12 mL) ile infüze etmişlerdir. Çalışma sonucunda infüze edilen 50 ng melatonin dozunun 20:00-21:00 zaman aralığında yetişkin hamsterlerin testislerinin fonksiyonel durumunu değiştirmede etkili olmadığını göstermişlerdir.

Karakaş ve Gündüz (2006), Suriye hamsterlerinde leptin hormonu salınım ritminin suprakiazmatik nukleus tarafından kontrol edilip edilmediğini araştırmışlardır. Deneylerini SCN lezyonlu grup, farklı beslenme düzenekleri, adenalektomi uygulaması sonrası sabit glukokortikoid salınımı için kortizol kapsülleri yerleştirilen grup şeklinde hazırlamışlardır. Sonuç olarak farklı beslenme rejimleri ve sürekli glukokortikoid salınımının leptin ritmini değiştirmede fakat SCN lezyonlarının ise bu ritmi ortadan kaldırdığını tespit etmişlerdir.

Gündüz vd. (2009), Suriye hamsterlerinde leptin hormonu ve pinealektominin testis seminifer tübüllerinin epitelindeki proliferatif ve apoptotik süreçler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Proliferatif ve apoptotik süreçleri, çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) ve kaspaz-3 immün boyamaları ile yarı kantitatif olarak değerlendirmişlerdir. Kontrol, pinealektomi, intraperitoneal olarak 10 µg/mL leptin uygulanan ve pinealektomi+leptin uygulanan gruplar şeklinde deney düzeneklerini oluşturmuşlardır. Her grubu 2 ay süresince uzun ve kısa fotoperiyotlara maruz bırakmışlardır. Kısa fotoperiyodun testis üzerindeki baskılayıcı etkisini gözlemlemişlerdir. Pinealektominin, kısa fotoperiyodun baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdığını fakat uzun fotoperiyodun uyarıcı etkisinin değiştirmede belirtmişlerdir.

Karakaş vd. (2011), pinealektomi yapılan dişi Suriye hamsterlerinde melatonin ve leptin hormonları uygulamasının yumurtalık foliküler gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Pineal bezinin çıkarılması ve leptin hormonu uygulamasının uyarıcı etkisi olduğunu melatonin hormonunun ise foliküler gelişim üzerinde baskılayıcı olarak rol aldığını ortaya koymuşlardır.

Gündüz ve Karakaş (2011), üç farklı metod ile leptin uygulamasının, devamlı karanlıktaki Suriye hamsterlerinin lokomotor aktivitesi üzerine olan etkileri araştırmışlardır. Hamsterlere, intraperitoneal enjeksiyon (Ip) (4 µg/kg), deri altı (Sc) infüzyon (4 µg/kg) ve

SCN içine infüzyon (0,4 µg/ kg) ile leptin, sirkadiyen zaman ile 10'da, üç gün boyunca uygulamışlardır. Suriye hamsterlerinde lokomotor aktivitenin, leptin uygulaması ile öne kayabileceğini göstermişlerdir. Leptinin, uygulanan metoda bağlı olarak farklı safha kayma etkileri meydana getirdiğini tespit etmişlerdir. En büyük faz kayması SCN içine leptin infüzyonu, en küçük faz kayması ise intraperitoneal leptin enjeksiyonu ile gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Boggio vd. (2013), uzun ve kısa fotoperiyotlarda yetişkin erkek Suriye hamsterlerinde leptin uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Farklı dozlarda uygulanan leptinin testis ağırlığında ve seminifer tübüllerde küçülme, serum LH ile GnRH seviyelerinde önemli ölçüde azalma meydana getirdiğini ortaya koymuşlardır. *Ad libitum* olarak beslenen erkek Suriye hamsterlerinde üreme eksenini inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir.

Ikeno vd. (2014), loş ışığın geceleri sirkadiyen saatin işlevini bozduğunu ve fotoperiyodik tepkinin moleküler mekanizmaları etkilediğini tespit etmişlerdir.

Chakir vd. (2015), pineal bezin salgısı olan melatoninin, metabolik hormonların ve glikozun günlük ritmini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. Bu amaçla 16L ve 8L'ye maruz bırakılan Sham Pinx ve Pinx gruplarında plazma leptin, kortizol, insülin ve glikozun günlük değişimlerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda melatoninin plazma leptinin günlük ritmini yönlendirdiğini, kortizol ritminin faz kontrolüne katıldığını ve fotoperiyoda bağlı metabolik duruma göre glikoz homeostazını düzenlediğini göstermişlerdir.

Grosbellet vd. (2015), leptinin, SCN üzerindeki doğrudan veya dolaylı etkiler yolu ile obezite ile ilişkili zamanlama değişikliğine dahil olup olmadığını araştırmışlardır. Fotik senkrenizasyon, yüksek dozlarda leptin (5 mg/kg) enjekte edilmiş ve edilmemiş obez ob/ob farelerinde (leptin eksikliği olan) incelenmiştir. Çalışma sonucunda metabolik bozukluklar ve sirkadiyen bozulmalar arasındaki ilişkide leptinin merkezi bir rolü olduğunu vurgulamışlardır.

Bujis vd. (2017), Wistar farelerinde SCN- arkuat nukleus (ARC) ara bağlantısını etkili bir şekilde ortadan kaldıran mikroklesiklerin, sürekli karanlık (DD) koşullarda lokomotor aktivitede, kortikosteron seviyelerinde ve vücut sıcaklığında ritmik bir kayba yol açtığını göstermişlerdir.

Brown vd. (2001), erkek Suriye hamsterinde GnRH mRNA'nin fotoperiyodik değişimini incelemişlerdir. Hamsterler uzun (14L: 10D) ve kısa (6L: 18D) fotoperiyotlara maruz bırakılmıştır. Kısa fotoperiyotta bulunan hamsterlerde 12 haftalık süreçte testis kütlelerinde ve serum testosteron seviyelerinde belirgin düşüş gözlenmiş ancak 22 hafta sonunda ise bu üreme parametreleri tekrar incelendiğinde önemli ölçüde yükselme kaydetmişlerdir. Her iki periyotta da yapılan kantitatif *in situ* hibridizasyon histokimyasında aynı yaş grubunda yer alan kontrol grupları arasında fark gözlenmez iken, deney gruplarında yaşa bağlı düşüş olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak fotoperiyoda bakılmaksızın GnRH mRNA seviyelerinin yaşa bağlı düşüş göstermesinin yaşlı hamsterlerde doğurganlığın azalabileceğini vurgulamışlardır.

Ansel vd. (2010), melatonin ve eşey steroidlerinin ARC ve AVPV'de Kiss1 ekspresyonunu farklı şekilde düzenleyip düzenlemediğini belirlemişlerdir. Kısa gün uzunluğunda hem dişi ve hem erkek hamsterlerin ARC ve AVPV'sinde Kiss1 ifadesinde önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Yanı sıra kısa gün koşullarındaki her iki cinsiyetteki eşey steroid uygulaması, AVPV'de Kiss 1 nöron sayısını arttırırken, ARC'de ise azaltmıştır. Uzun gün koşullarında ise melatonin uygulaması hem AVPV hem de ARC'de Kiss 1 mRNA seviyesini azaltırken, kastre edilmiş hamsterlerde ise ARC'de Kiss 1 ifadesini inhibe etmiştir. Ancak kısa gün koşullarındaki pinealektomili hamsterlerde ARC'deki Kiss 1 nöronlarının sayısının artışı olmasına rağmen AVPV'de artış meydana gelmemiştir. Çalışmanın sonucunda tüm bu verileri birlikte değerlendirdiklerinde ARC Kiss 1 nöronlarının Suriye hamsterinin gonadotropik eksen üzerindeki melatonin etkilerine aracılık ettiğini belirtmişlerdir.

Ancel vd. (2012), RFRP-3'ün gonadotropik eksen üzerindeki etkisini araştırmışlardır. RFRP-3'ün akut merkezi enjeksiyonu GnRH nöronlarında c-FOS ifadesini indüklediğini ve LH, FSH ve testosteron salınımını arttırdığını göstermişlerdir. RFRP-3'ün kronik merkezi uygulaması, fotoinhibitör koşullarına rağmen hamsterlerin arkuat nukleusundaki testiküler aktiviteyi ve Kiss-1 seviyelerini eski haline getirir. Fakat RFRP-3'ün hipofizyotropik etkisi yoktur. Bu bulgular, RFRP-3'ün erkek Suriye hamsterinde, hipotalamik hedefler yolu ile üreme eksen üzerinde uyarıcı etki uyguladığını göstermektedir.

Piekarski vd. (2014), uzun ve kısa gün koşullarında pinealektomi yaptıkları dişi Türk hamsterlerinde kisspeptin ve GnIH (RFRP-3) değişimlerini incelemişlerdir. Çalışma

sonucunda kısa gün koşulunda pinealektomi harici grupların uterus ağırlıklarında artış meydana geldiğini belirlemişlerdir. Dorsomedial hipotalamik çekirdekdeki RFRP-3 immünoreaktif hücrelerinin sayısı ve boyutu kısa gün koşullarındaki gruplarda daha fazla olarak tespit edilmiştir.

Gotlieb vd. (2019), GnRH sisteminin zamana bağlı hassasiyetinin kisspeptine özgü olup olmadığını veya daha yaygın bir düzenleyici kontrol mekanizması olup olmadığını incelemek için, GnRH sisteminin RFRP-3 inhibisyonuna verdiği yanıtta günlük değişiklikleri araştırmışlardır. Dişi Suriye hamsterlerinin östradiol (E2)- negatif feedback'ini ortadan kaldırmak için ovariektomi yapılmış, sabah veya öğleden sonra merkezi olarak RFRP-3 veya salin uygulaması yapılmıştır. LH konsantrasyonları ve Lh β mRNA ekspresyonu, sabah RFRP-3 ve salinle tedavi edilen gruplar arasında farklılık göstermediğini, ancak öğleden sonra RFRP-3 uygulamasıyla belirgin şekilde baskılandığını belirtmişlerdir. Ancak, dolaşımdaki LH'nin RFRP-3 inhibisyonu GnRH sistemi aracılığıyla hareket ettiğinin söylenemeyeceğini çünkü medial preoptik alan GnRH veya RFRP-3 reseptörü Gpr147 mRNA ifadesinde herhangi bir fark gözlenmediğini bildirmişlerdir. Aksine, RFRP-3 arkuat nukleus Kiss 1 mRNA ifadesi baskılanmış ve potansiyel olarak hipofiz gonadotropolarını doğrudan etkilemiştir. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, üreme ekseninin RFRP-3 inhibisyonuna, muhtemelen arkuat nukleus kisspeptin nöronlarının bu nöropeptide duyarlılığındaki değişiklik yolu ile zamana bağlı yanıt verdiğini ifade etmişlerdir.

Chakir vd. (2021), kısa fotoperiyoda geçiş nedeni ile pinealektominin ve foto refrakter fazda ise gonadoektominin Clock mRNA seviyeleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Suprakiazmatik nukleusda Clock seviyelerinin günlük değişiminin melatonin veya testosteron seviyelerinden bağımsız olarak, fotoperiyodik değişikliklerden ve kısa fotoperiyotta geçirilen süreden etkilendiğini bildirmişlerdir.

Suriye hamsteri ya da golden hamsteri (*Mesocricetus auratus*) Cricetidae familyasına bağlı bir türdür. Suriye hamsterleri sirkadiyen ritim çalışmalarında tekerlek koşu aktivitesinde günlük ritim göstermeleri nedeniyle yaygın olarak kullanılır (Elliot, 1976; Hoffmann, 1982). Suriye hamsterleri gün uzunluğunun çeşitli mekanizmalarını aydınlatan güçlü fotoperiyodik özelliklerinden dolayı laboratuvar modeli olarak da tercih edilir. Suriye hamsteri, üreme aktivitesi fotoperiyot veya ortam sıcaklığındaki değişikliklerden etkilenen mevsimsel üreme özelliğine sahiptir. Ayrıca, kısa fotoperiyotlara yanıt olarak belirgin gonadal atrofi nedeniyle mevsimsellik çalışmalarına da uygundur (Gaston ve Menaker,

1967). Suriye hamsterlerinin fotoperiyodik özelliklerinden dolayı birçok fizyolojik parametrelerinde gün ışığına bağlı olarak değişimler meydana gelmektedir. Işığa bağlı olarak pineal bezinden salınan melatonin hormonunda meydana gelen ritmik artma ve azalma oldukça önemlidir. Melatonin hormonu geceleri artarken gündüzleri azalmaktadır. Ayrıca beslenme ile yakın ilişkisi olan leptin hormonu da fotoperiyoda bağlı olarak değişimler gösterebilmektedir. Pinealektomi, üreme döngülerinin çevresel fotoperiyodik döngüden desenkronizasyonuna yol açmaktadır. Suprakiazmatik nukleusun (SCN) lezyonu, lokomotor aktivitenin sirkadiyen ritimlerini ortadan kaldırmaktadır. Tüm memeli türlerinde hipotalamo- hipofiz- gonadal eksen hormonları üremenin endokrin kontrolünde rol oynamaktadır.

Bu çalışmada;

1. Değişik fotoperiyotlarda üreme ile ilişkili nöronlar ve ilgili hormonların ritmik değişimlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.
2. Bu değişimlerin pineal bezin yokluğunda ve ayrıca suprakiazmatik nukleus yokluğunda nasıl değişim gösterdiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 . Hayvan Materyali

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezine (COMÜDAM) bağlı Hamster ve Gerbil Ünitesinde bulunan koloniden üretilen yetişkin (3-4 aylık) erkek *Mesocricetus auratus* (Suriye hamsterleri) kullanıldı. Hamsterlerde doğumdan itibaren 16L (16 saat aydınlık, 8 saat karanlık; ışıklar saat 04:00-20:00 arası açık) ışık düzeneği kullanıldı. Aydınlatma, otomatik programlanabilir zamanlayıcılar tarafından kontrol edilen soğuk beyaz floresan tüplerle sağlandı. Hamsterler deney süresine kadar polipropilen kafeslerde (16x31x42 cm) talaş kullanılarak 5'er adet şekilde bakıldı. Hamsterlerin yer aldığı havalandırılmalı odaların sıcaklığı 22±2 °C olarak standardize edildi. Çalışma süresince hamsterler *ad libitum* beslendi. Çalışmalar, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 2019/ 06-09 karar numarası izniyle gerçekleştirildi (Ek-1).

3.2. Deney Düzeneği

Çalışma uzun (16L) ve kısa (8L) fotoperiyotta gerçekleştirildi. Uzun fotoperiyotta (16L= 16 saat ışık; ışıklar saat 20:00'da kapanıp, saat 04:00'da açıldı) hayvanlar üç gruba ayrıldı. Bunlar,

1. Kontrol grubu
2. Pinealektomili grup
3. Suprakiazmatik nukleus (SCN) lezyonlu grup

Her bir grupta doku ve kan alım örneklerinin alım zamanlarına bağlı olarak 4 alt grup oluşturuldu. Bu alt gruplar;

- a) Işıkların kapandığı an (n=5)
- b) Gece yarısı (n=5)
- c) Işıkların açıldığı an (n=5)

d) Gün ortası (n=5)

şeklindedir.

Çalışmanın kısa fotoperiyotta (8L= 8 saat ışık; ışıklar saat 20:00'da kapanıp, saat 12:00'da açıldı) yapılan kısmı da uzun fotoperiyot prosedürünün benzeridir.

Tablo 2

Deney düzeneği

Uzun Fotoperiyot (16L:8D)	Kısa Fotoperiyot (8L:16D)
Işıkların kapandığı an (20:00) (n=5)	Işıkların kapandığı an (20:00) (n=5)
Gece yarısı (00:00) (n=5)	Gece yarısı (04:00) (n=5)
Işıkların açıldığı an (04:00) (n=5)	Işıkların açıldığı an (12:00) (n=5)
Gün ortası (12:00) (n=5)	Gün ortası (16:00) (n=5)

Çalışmada kullanılan yetişkin hamsterler 3 aylık hamsterler olup ağırlıkları yaklaşık 100 gram olan hayvanlardır. Bu hayvanlar 16 L fotoperiyoduna adapte olmuş üreme bakımından yetişkin hamsterlerdir. Kısa fotoperiyotta kontrol ve deney gruplarının oluşturulması için ise uzun fotoperiyotta koloniden alınan hayvanlar 2 ay süreli olarak testis ölçümü yapılarak takip edildi. Testislerinde küçülme gösteren hayvanlar kısa fotoperiyot deney gruplarına dahil edildi.

Alt gruplarda oluşturulan hayvanların sayıları 20 tane olup toplamda 3 grupta kullanılan hayvan sayısı 60'tır. Çalışma benzer şekilde kısa fotoperiyotta da (8L= saat ışık; ışıklar saat 20:00'da kapanıp, saat 12:00'de açıldı) ayrı devam ettiği için uzun ve kısa fotoperiyotta toplamda 120 tane hayvan kullanıldı.

Deney gruplarına dahil edilecek tüm hayvanlar çalışma aktivite tekerleklerine teker teker konularak ritmik aktiviteleri 15 gün boyunca takip edildi. Düzenli ritmik aktivite gösteren hayvanlar üzerinde SCN lezyon operasyonları yapıldı.

Deney sonunda alt gruplarda belirtilen zaman dilimlerinde hayvanlar dekapite edilerek beynin hipotalamik bölgesi alındı. Ayrıca dekapitasyon esnasında hayvanlardan kan

temin edilerek melatonin ve leptin hormonlarının ritmik değişimleri ELISA yöntemiyle ortaya kondu. GnRH, GnIH ve Kisspeptin nöronlarının mRNA ifadeleri QRT-PCR tekniği, protein seviyelerinin belirlenmesinde ise Western Blot tekniği kullanıldı.

Bu gruplarda ayrıca deney sonunda beyin dokusu alınırken kafatasında pineal bezin bulunduğu bölge görsel olarak kontrol edilip pinealektominin başarısı doğrulandı.

3.3. Deneysel Prosedürler

3.3.1. Testis Ölçümü

Uzunluk ve genişlik, skrotumda sol testisin dış palpasyonu ile 0,1 mm'ye en yakın kumpas ile ölçüldü. Testislerin boyut olarak farklılığından şüphe edildiğinde her ikisi de ölçüldü. Eşleştirilmiş testis hacmi, sferoid formülü kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Hacim} = 0,5236 (\text{boy})(\text{en})$$

Bu tek testis hacmi (STV), lineer regresyon formülü kullanılarak eşleştirilmiş testis ağırlığına (PTW) dönüştürüldü,

$$\text{PTW} = 1,846 (\text{STV}) - 0,015$$

testis ölçümlerinden elde edilen tüm veriler, bu yöntemle elde edilen eşleştirilmiş testis ağırlıkları şeklinde belirtildi.

3.3.2. Anestezi

Ameliyattan önce hamsterlere deri altından ketamin [(20mg/kg vücut ağırlığı) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA)] ve intraperitoneal olarak pentobarbital [(32,5 mg/kg vücut ağırlığı) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA)] ile anestezi uygulandı. Anestezi derinliği, bacak refleksleri ve aktif kas tonusu sık sık test edilerek izlendi.

3.3.3. Pinealektomi (Pineal Bezin Çıkarılması)

Pinealektomi, Hoffman ve Reiter (1965)'in belirttiği metoda göre yapıldı. Kanamayı önlemek için aspirasyon yöntemi laboratuvarımızda geliştirilen tekniğe göre uygulandı. Anestezili [ketamin (20 mg/kg) ve pentobarbitol (32,5 mg/kg)] hayvanların başlarının sabitleştirilmesi için stereotaksik alete yerleştirildi. Kafatasında yaklaşık 0,5 cm çapında delinecek bölge %70'lik alkol ile temizlendikten sonra kafatasının dorsal kısmındaki kas bağlantıları ayrılarak lamda bölgesinin üzerinden 'dental dril' adı verilen alet ile kraniyumun 0,5 cm çapındaki parçası kesilerek öne doğru eğildikten sonra stereo mikroskop altında ucu ince mikro pens yardımı ile pineal bezine ulaşılarak bez çıkarıldı. Bu işlem tamamlandıktan sonra kraniyumun kesilen parçası yerine konularak, kanama durdurucu sünger parçası yerleştirildikten sonra deri ameliyat klipsleri ile kapatıldı. Deneyler tamamlandıktan sonra hamsterler dekapite edilerek beyinleri açılarak pineal bezin çıkarılıp çıkarılmadığı kontrol amacıyla tespit edildi.

3.3.4. Suprakiyazmatik nukleus (SCN) Lezyonu

Hayvanlar deney öncesinde aktivite kafeslerine konularak 15 gün süresince 24 saatlik ritimleri incelendi. Ritmi düzenli olan gösteren hamsterlere [ketamin (20 mg/kg) ve pentobarbitol (32,5 mg/kg)] ile anestezi yapıldı. Kafatasında bir delik açıldıktan sonra, stereo taksik koordinatlar (Bregmaya göre; anterior +0,6 mm; ventral -7,8 mm; lateral $\pm 0,1$ mm) kullanılarak SCN bölgesine bir elektrot yerleştirildi. Lezyonlar uç kısmındaki 0,3 mm dışında yalıtılmış paslanmaz çelik tel elektrot içinden akım enjeksiyonu (5 saniye 5mA) ile oluşturuldu (Ugo Basile Lesion- Making Device, Model 3500; Ugo Basile, Comerio, Italia). Operasyon sonrasında 2 hafta iyileşme süreci beklendi. Lezyonları doğrulamak için deneylerin sonunda hamsterlerin beyinleri histolojik olarak incelendi.

3.3.5. Lokomotor Aktivite Ölçümü

Tekerlek çalıştırma aktivitesi, bir veri toplama sistemi (Mini Mitter Company, Bend, Oregoni ABD) tarafından kaydedildi. Hamsterler her biri, her devirde kafesin dışına monte edilmiş bir mikro anahtarı kapatan bir çalışan tekerlek ile donatılmış polipropilen kafeslere ayrı ayrı yerleştirildi. Tekerlek devir sayıları 15 dakikalık kutularda saklandı. Faaliyet

kayıtlarının grafik gösterimi ve analizi Vital View Yazılımı (Mini Mitter Company, Bend, Oregon; ABD) kullanılarak yapıldı.

3.3.6. Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Hamsterler deney süresi sonunda belirlenen zaman dilimlerinde dekapite edilerek hipotalamus bölgesi dokunun canlılığını sağlayan %9'luk NaCl solüsyonunda stereo diseksiyon mikroskobu (Stereomicroscope Stemi DV 4- ZEISS) altında çıkarıldı. Dokular (30-50 mg) RNA izolasyonuna kadar – 86 °C'de saklandı. Kan örneklerinden de santrifüj (Cence L- 500) yardımı ile elde edilen serumlar analize kadar –20 °C'de saklandı.

3.3.7. Hormon Ölçümü

Kan numuneleri melatonin ve leptin ölçümleri için deney sonunda alt gruplarda belirlenen zaman dilimlerinde vakumlu jelli tüp aracılığıyla yaklaşık 5 mL miktarında alındı. Karanlık fazda örneklerin alımı, loş kırmızı ışık altında gerçekleştirildi. Kan örnekleri 4000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi (Cence L- 500). Analize kadar -20 °C'de donduruldu. Hormonlar, ticari ELISA kitleri (BioAssay- Technology Laboratory, Rat Melatonin, E0601Ra; BioAssay- Technology Laboratory, Rat Leptin E051 Ra) ile üreticinin talimatlarına göre ölçüldü. Optik yoğunluklar, otomatik mikrolaka okuyucuda 450 nm'de belirlendi (Thermo Scientific, Multiskan FC Mikrolaka Okuyucu, USA) aracılığıyla okutuldu.

3.4. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Kisspeptin, GnRH ve GnIH gen anlatımlarının kantitatif olarak belirlenmesinde RT - qPCR tekniği kullanılmıştır. Analiz, Mstlab AR-GE ve Uygulama Laboratuvarı tarafından hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Doku Homojenizasyonu ve Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu üretici firmanın (PureLink™ RNA Mini Kit Cat No: 12183018A-AMBION By life Technologies, Applied Biosystems) önerdiği yönteme göre gerçekleştirildi.

-86 °C’de saklanan doku örneklerinin içerisine 500 µL lizis tamponu ve 60 mg zirkonyum öğütme boncukları ile birlikte 200 µL PBS (Ca ve Mg içermeyen), 5 µL Proteinaz K (20 mg/mL) eklendi (Tablo 3). Dokular, PureLink™ RNA Mini Kit tarafından önerilen miktarlarda hazırlanan lizis tamponu kullanılarak homojenize edildi (Next advance, Bullet Blender Storm, USA).

Tablo 3
Doku homojenizasyonu

	Miktar (µL)
Lizis tamponu	500
14,3 M Beta merkaptöetanol	10
Toplam	510

Elde edilen homojenat 2 mL’lik santrifüj tüpüne aktarılarak 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 500 µL fosfat tamponu eklenerek vorteks ile karışımı sağlandıktan sonra 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Karışımın üzerine 200 µL kloroform izomilalkol (49:1) eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Karışım 4°C’de 12000 xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra 600 µL süpernatantın üzerine 1,25 kat 800 µL %96’lık etanol eklendi. 700 µL lizat kolona transfer edilerek oda sıcaklığında 12000 x g’de 20 saniye santrifüj edildi. Tüp dökülerek kolon tekrar tüpün içerisine yerleştirildi. Tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu basamak tekrarlandı. Kolonun üzerine 700 µL wash buffer 1 solusyonu eklenerek oda sıcaklığında 12000 x g’de 20 sn santrifüj edildi. Tüp dökülerek kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi. Kolonun üzerine 600 µL wash buffer 2 solusyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g’de 20 sn santrifüj edildi. Tüp dökülerek kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi. Kolon tekrar 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi ve kolon 1,5 mL’lik eppendorf tüpün üzerine yerleştirildi. Kolonun merkezine 50- 100 µL, 65- 70 °C’de bekletilmiş ultra distile su eklenerek, oda sıcaklığında 12000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi.

3.4.2. RNA miktarının hesaplanması

RNA konsantrasyonu 260 nm’de nanodrop cihazı ile (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers) ile ölçülmüştür.

3.4.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi (A. B. T Synthesis Kit with Rnase Inh. (High- Capacity) C03-01-05) üretici firmanın önerdiği yönteme göre yapıldı. Buz üzerinde çözdürülen her bir örnek için reaksiyon karışımları hazırlandı (Tablo 4). cDNA sentezi için, toplam hacim 10 µL olacak şekilde reaksiyon hazırlandı (Tablo 4).

Tablo 4

cDNA sentezinin hazırlanışı

	Miktar (µL)
5X Reaction Buffer	4
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ µL)	1
10 mM dNTP Mix	1
RevertAid H Minus M- MuLV Reverse	2
Transcriptase (200 U/ µL)	
Random hexamer primer	2
Toplam	10

Hazırlanan reaksiyon 1,5 mL’lik eppendorf tüplerine konularak eşit şekilde kuyucuklara dağıtıldı. Konsantrasyonu ölçülen RNA’lar eşit miktarda kullanılmak için dilüsyonları yapıldı. Reaksiyon PCR termal cyclus cihazında gerçekleştirildi(Tablo 5).

Tablo 5

cDNA sentezi reaksiyon koşulları

	1. adım	2. adım	3. adım	4. adım
Sıcaklık (°C)	25	42	70	4
Zaman (dak)	5	60	5	∞

3.4.4. Real Time QPCR Reaksiyonu

Gen anlatımının kantitatif olarak belirlenmesinde RT- qPCR tekniği kullanıldı. Reaksiyonlar 96 kuyucuklu Real Time PCR (StepOne™ Real-Time PCR System, Cat no:4376600) cihazında gerçekleştirildi.

Cihaza bağlı donanımlardan masaüstü bilgisayara ait yazılım (StepOne Software v2.0 for Applied Biosystems) ile reaksiyon evreleri izlendi ve mRNA kantitasyonunun belirlenmesinde Sybr Green yöntemi kullanıldı. Sybr Green boya, çift sarmallı DNA'nın küçük oluşuna bağlanarak floresan yoğunluğunu arttırdı. Daha fazla çift sarmallı ampikon üretildikçe, Sybr Green boya floresansı artmıştır. PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe serbest kalan Sybr Green boyasının verdiği floresan ışığa Real Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her bir örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri cihaz tarafından hesaplandı. Real time PCR reaksiyonları 96'lık plate'ler kullanılarak gerçekleştirildi.

3.4.5. RT- QPCR Reaksiyonu Hazırlanışı

Dilüsyonları yapılan cDNA'ların buz üzerinde çözümleri sağlandı. Hazırlanan stok primerler 10 µM olacak şekilde dilüe edildi (Tablo 6, 7).

Tablo 6

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primerler

Primerler	Sekans 5'-3'	Ürün boyutu (bp)	Tm (°C)	Kaynak
Beta Aktin (Forward)	5'-ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC-3'	186	61,8	Custom Design
Beta Aktin (Reverse)	5'-CTGACCCATACCCACCATCAC-3'	186	62,6	Custom Design
GnIH (Forward)	5'-ATGAGAAAAGAAGCCCCGCA-3'	173	58,9	Custom Design

Tablo 6 devam ediyor

GnIH (Reverse)	5'-CATGACGTAGAGCAACTCGC-3'	173	57,4	Custom Design
GnRH (Forward)	5'-CCGGCATTCTACTGCTGACT-3'	129	58,3	Custom Design
GnRH (Reverse)	5'-CCTCCTTGCCCATCTCTTGG-3'	129	60,5	Custom Design
Kisspeptin (Forward)	5'-CTCTGTGTCGCCACCTATGG-3'	126	59,6	Custom Design
Kisspeptin (Reverse)	5'-AGGCTTGCTCTCTGCATACC-3'	126	58	Custom Design

Tablo 7

RT- PCR reaksiyonu hazırlanışı

	Miktar (μ L)
Master mix	10
cDNA	2
Primerler	2
Nükleaz içermeyen su	6
Toplam	20

Örnekler hazırlanarak kuyucuklara dağıtıldı. Cihazda sıcaklık ve süre değerlerine göre işlem yapıldı (Tablo 8).

Tablo 8

RT- qPCR koşulları

	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Zaman	Tekrar
İlk denatürasyon	95	5 dak	1
Denatürasyon	95	15 s	40
Bağlanma (Beta Aktin)	60	15 s	40

Tablo 8 devam ediyor

Bağlanma (GnIH)	55	15 s	40
Bağlanma (GnRH)	55	15 s	40
Bağlanma (Kisspeptin)	55	15 s	40
Hibridizasyon/Uzatma	72	30 s	40

3.5. Western Blot

Protein ekspresyonunun belirlenmesinde Western Blot metodu kullanıldı. Analiz Mstlab Ar- Ge ve Uygulama Laboratuvarı tarafından hizmet alımı olarak gerçekleştirildi.

Hipotalamus dokusunun homojenizasyonu, RIPA lizis tamponu [Thermo Scientific Pierce RIPA Buffer 89901] içinde homojenizatör (Next advance, Bullet Blender Storm, USA) aracılığı ile gerçekleştirildi. Örnekler +4 °C'de 14.000 g'de 15 dak santrifüj edildi. Protein saflaştırması üretici firma tarafından önerilen yönergeye göre yapıldı (Thermo Scientific™ Invitrogen AgRP Polyclonal Antibody Cat No: PA5-78739). Daha sonra LDS Sample Buffer ve Sample Reducing Agent eklendi. 70°C 'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda +4 °C'de bekletildi. Bolt™% 4-12 Bis-Tris Plus Jel kullanıma hazırlanarak yürütme işlemi Running Buffer 1X solusyonu ile gerçekleştirildi. Yürütme işlemi 200 voltta 35 dakika yapıldı (Mini Gel Tank, invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Transfer işlemi için Thermo Fisher Scientific IBlot 2 Dry Blotting System kullanıldı. IBlot 2 cihazının kendine ait sandviç şeklindeki membran aktarım sistemi (IBlot™ 2 Transfer Stacks) kullanılarak 20 voltta 7 dakikada jelden membrana aktarım işlemi yapıldı. Transfer işleminden sonra iBind™ Flex Solution Kitinden Bloking solusyonu (40 mL saf su+ 10 mL 5X Buffer+ 500 µL 100X Additive Solusyonu) hazırlandı. Transfer kağıdındaki jel görüntüsü kesilmiş ve bloking solusyonu içerisinde 5 dakika bekletildi. Antikor uygulama işlemi ise Invitrogen™ iBind™ Flex Western cihazında gerçekleştirildi. iBind™ Flex' e özel olan kart üzerinde first ve seconder antikorlar 2,5 saat içerisinde bağlama işlemi tamamlandı. Beta aktin, Kisspeptin, GnRH ve GnIH antikorları hazırlandı (β-Actin Antibody (N-21), Rabbit, sc-130656, Santa Cruz Biotechnology; Kisspeptin, Rabbit, bs-0749R-TR, Bioss Antibodies; GnRH, Rabbit, bs-1464R-TR, ALFAGEN, Bioss Antibodies; NPFV, Rabbit, NBP1-86724, Novus Biologicals). Bloking solusyonu ile ıslatılan iBind™ Flex kartına

membran yerleştirilerek 3 saat beklendi. iBind™ Flex'den çıkarılan membran ECL solusyonunda (1 mL Luminol/Enhancer solusyonu + 1 mL Peroksidaz solusyonu) bekletildi. Görüntüleme işlemi için kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanıldı. Bu görüntüleme sisteminin temeli kimyasal luminol olduğu için seconder antikora zėu substrat (ECL) kulanıldı. 1:1 hazırlanan ECL solusyonunda karanlık ortamda 5 dk membran inkübe edilerek görüntüleme işlemine geçildi. Genbox cihazında tabloya yerleştirilen membranda protein bantlarının tespiti için PC de ImagER Eyes programı kullanılarak fotoğrafı çekildi. Protein yoğunluğunu ölçmek için ise Image J (National Institue of Health, Washington, USA) programı kullanıldı.

3.6. İstatistik

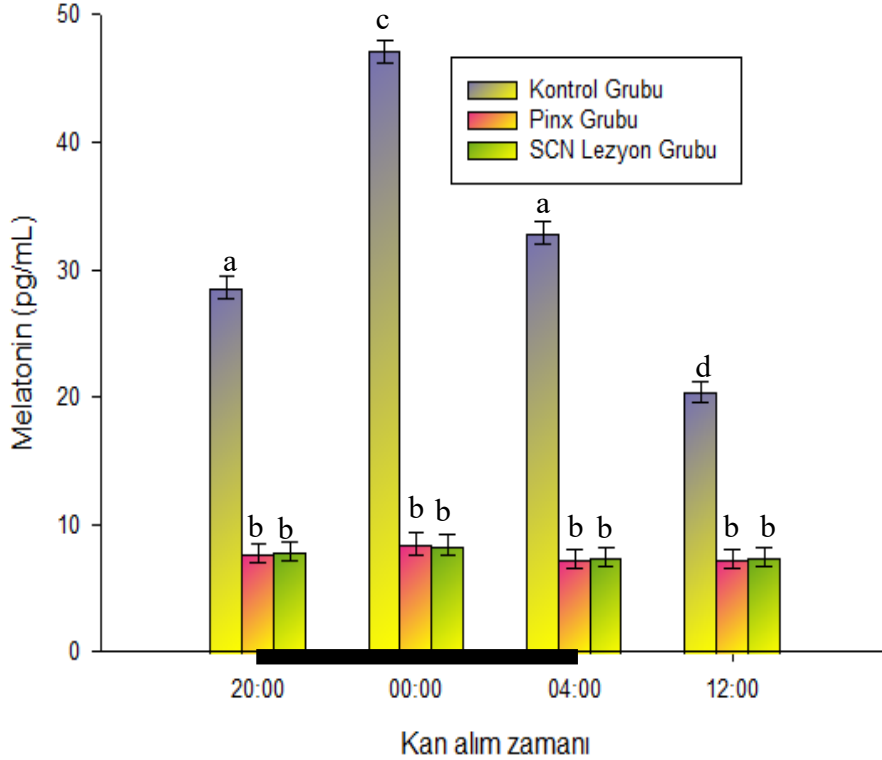
İstatiksel analizlerin gerçekleştirilmesi amacı ile SPSS 22 paket programı kullanıldı. Gruplar arasında her bir zaman diliminde ölçümlerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis analiz yöntemi kullanılmıştır. Kruksal Wallis analizi sonucunda anlamlı fark çıkan sonuçları farkın hangi gruplar arasında olduğu ise ikili olarak karşılaştırılmıştır ve bu bağlamda ise Mann- Whitney U parametrik olmayan analiz yöntemi kullanılmıştır. Veriler grafik olarak Sigma Plot 14.0 ile yapıldı. Gruplarda veriler ortalama \pm standart şeklinde ifade edildi. α anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlendi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

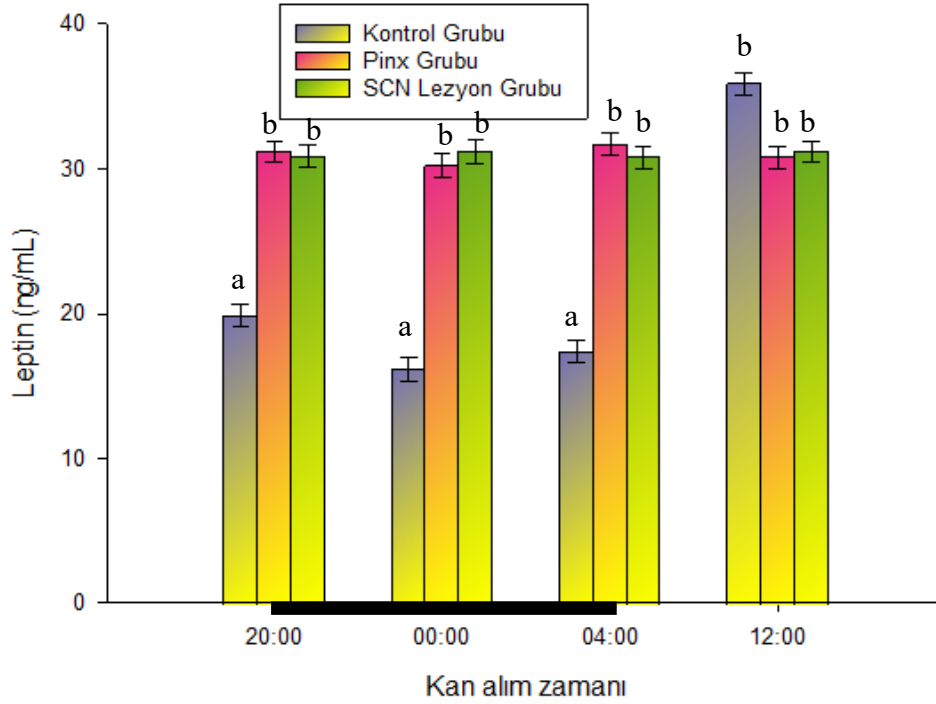
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Melatonin Hormonu ve Leptin Hormonu Değerleri

Şekil 7 ve Şekil 8’de 16L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) ait serum melatonin ve leptin seviyeleri gösterilmektedir. Kontrol grubuna ait hamsterlerde melatonin seviyesi ışıkların kapanması (20:00) ile artmaya başlamakta ($28,60 \pm 0,85$) gece yarısında (00:00) ise ulaştığı maksimum seviye ($47,09 \pm 0,83$) ile belirgin bir sirkadiyen ritim göstermektedir (Şekil 7). Serum leptin seviyesi ise gün ortasında (12:00) en yüksek noktasına ($35,86 \pm 0,74$) ulaşmaktadır (Şekil 8) ($p < 0.05$). Pinealektomi ve suprakiazmatik nukleus (SCN) lezyonu, hem serum melatonin hem de leptin seviyelerinin sirkadiyen ritimlerinin yok olması ile sonuçlanmıştır (Şekil 7-8).

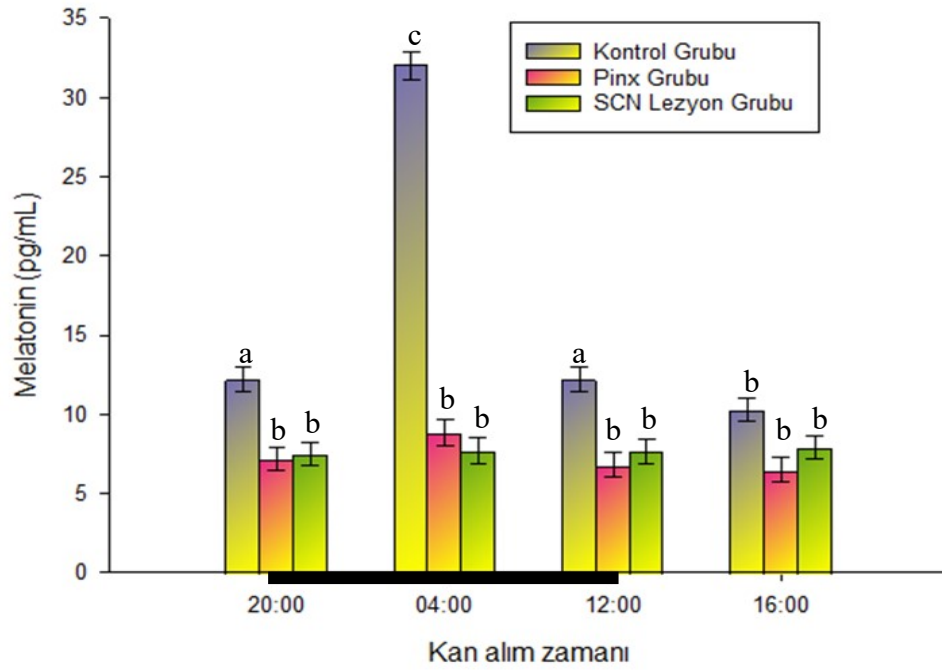


Şekil 7. Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinde melatonin (pg/mL) değerleri. Siyah bar karanlık periyodu göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (ort \pm std, $p < 0.05$).

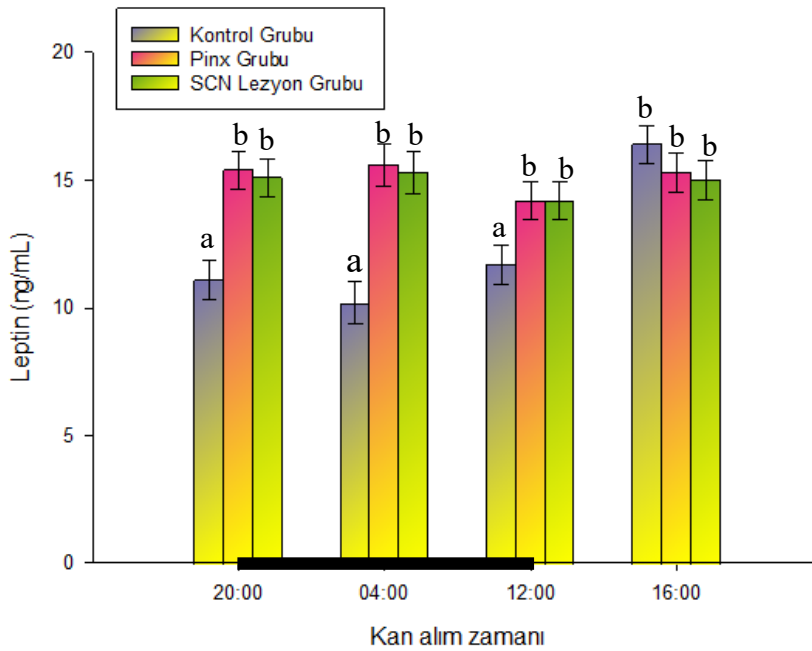


Şekil 8. Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinde leptin (ng/mL) değerleri. Siyah bar karanlık periyodu göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (ort ±std, $p < 0.05$).

Şekil 9 ve Şekil 10'da 8L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) ait serum melatonin ve leptin seviyeleri gösterilmektedir. Kontrol grubuna ait hamsterlerde serum melatonin seviyeleri gün ortası (16:00) düşük ($10,2 \pm 0,76$), gece yarısında (04:00) ise yüksek ($32,2 \pm 0,83$) olarak tespit edilmiştir. Deney gruplarında ise melatonin değerleri $6,5 \pm 0,74$ ve $8,8 \pm 0,83$ aralığında değişmektedir (Şekil 9). Serum leptin değerleri ise kontrol grubunda gün ortasında (16:00) daha yüksek seviyelere ($16,4 \pm 0,95$) ulaşmıştır. Deney gruplarında leptin değerleri $14,2 \pm 0,76$ ve $15,6 \pm 0,83$ pg/mL arasında değişmekte ve görünür bir günlük ritim bulunmamaktadır (Şekil 10) ($p < 0.05$). Pinealektomi ve suprakiazmatik nukleus (SCN) lezyonu 8L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerde her iki ritmi de ortadan kaldırmıştır (Şekil 9-10).



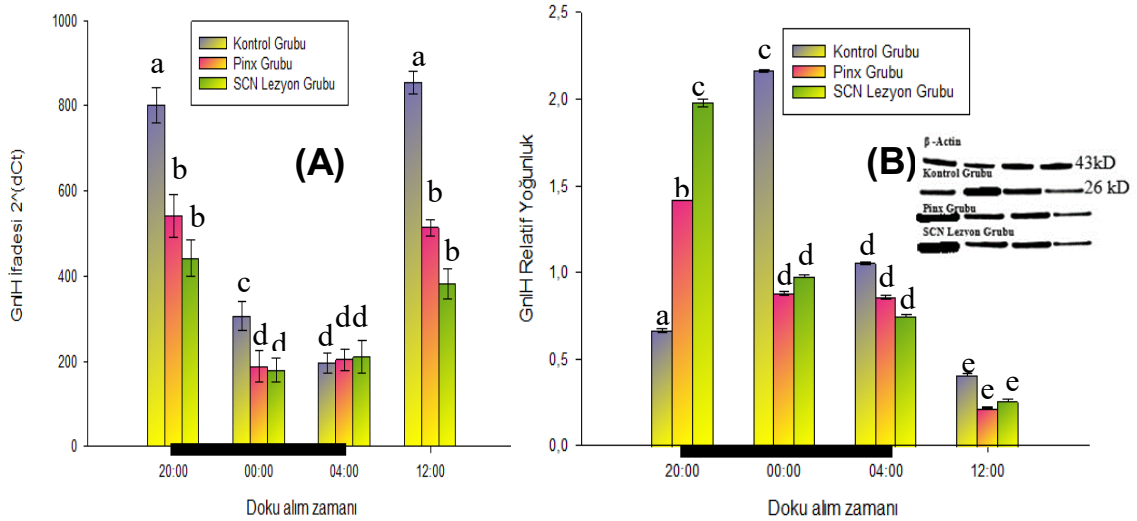
Şekil 9. Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinde melatonin (pg/mL) değerleri. Siyah bar karanlık periyodu göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (ort ±std, $p < 0.05$).



Şekil 10. Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinde leptin (ng/mL) değerleri. Siyah bar karanlık periyodu göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (ort ±std, $p < 0.05$).

4.2. Real Time PCR ve Western Blot Analiz Sonuçları

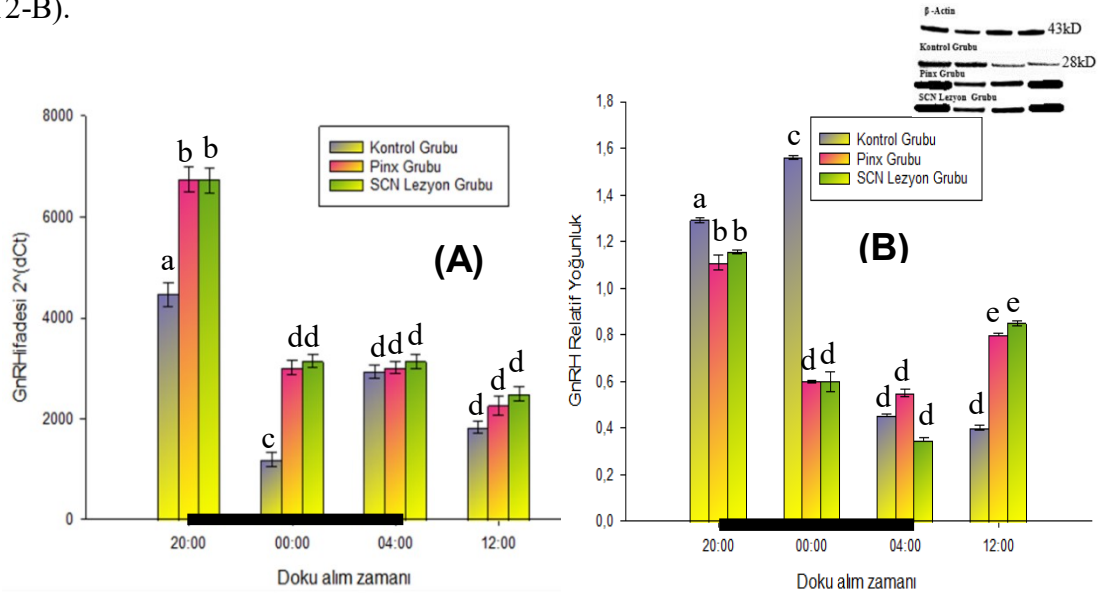
Şekil 11 (A-B)'de, 16L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) ait GnIH mRNA ifadeleri ve protein konsantrasyonları gösterilmektedir. GnIH mRNA ifadeleri kontrol grubunda ışıkların kapanması (20:00) ile azalmaya başlamıştır ve karanlık faz boyunca bu seviyelerde kalmıştır ancak gün ortasında ki değer 20:00 grubu değeri ile benzerdir (Şekil 11-A). Bu grupta relatif protein yoğunluğu ise gece yarısı (00:00) grubunda maksimum seviyesine ulaşır iken gün ortasında (12:00) minimum seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 11-B). Pinealektomili ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan gruplarda da GnIH mRNA ifadeleri ışıkların kapanması (20:00) ile azalmaya başlamış ve gece yarısı (00:00) ile ışıkların açılacağı zaman grubunda en düşük seviyesine ulaşmıştır (Şekil 11- A). Deney gruplarının relatif protein yoğunluklarına bakıldığında ise ışıkların kapandığı an (20: 00) artış gösterirken gün ortasında (12:00) belirgin derecede azalış göstermektedir (Şekil 11-B).



Şekil 11. Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B). Siyah bar karanlık fazı göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (p<0.05).

Şekil 12 (A-B)'de 16L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) ait GnRH mRNA ifadeleri ve protein konsantrasyonları gösterilmektedir. GnRH mRNA ifadeleri kontrol grubunda ışıkların kapanması (20:00) ile azalmaya başlamıştır. Gece yarısında (00:00) en düşük noktada tespit edilmiştir (Şekil

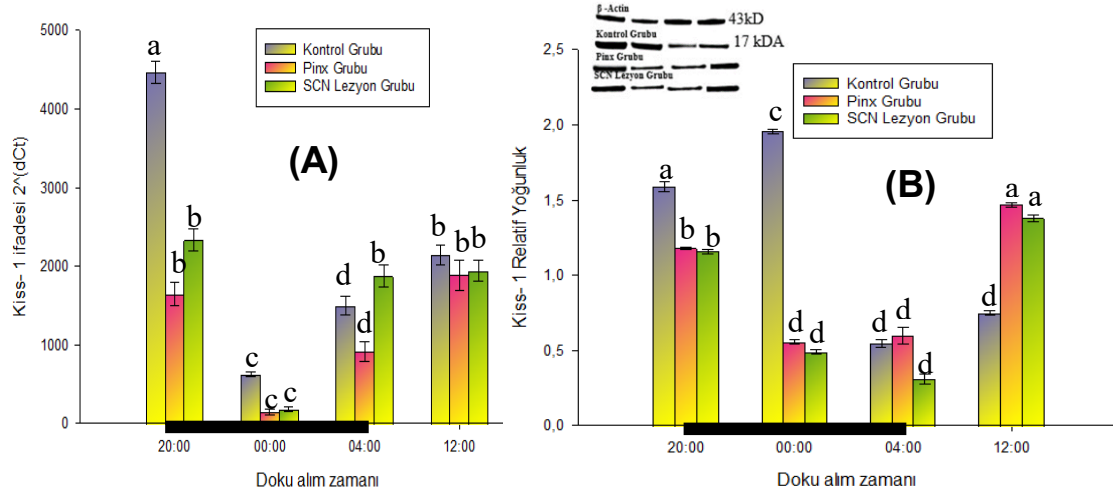
12-A). Bu grupta relatif protein yoğunluğu ise gece yarısında (00:00) maksimum seviyesine ulaşmıştır. Işıkların açıldığı anda (04:00) ve gün ortasında (12:00) ise yoğunlukta azalma tespit edilerek aralarında fark görülmemiştir (Şekil 12-B). Pinealektomili ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan gruplarda da GnRH mRNA ifadeleri ışıkların kapandığı anda (20:00) maksimum seviyeye ulaştığı diğer zaman gruplarında ise benzer kaldığı görülmüştür (Şekil 12-A). Deney gruplarının relatif protein yoğunluklarına bakıldığında ise ışıkların kapandığı anda (20:00) artış gösterirken gece yarısı (00:00) ve ışıkların açıldığı anda (04:00) belirgin derecede azalış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 12-B).



Şekil 12. Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B). Siyah bar karanlık fazı göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (p<0.05).

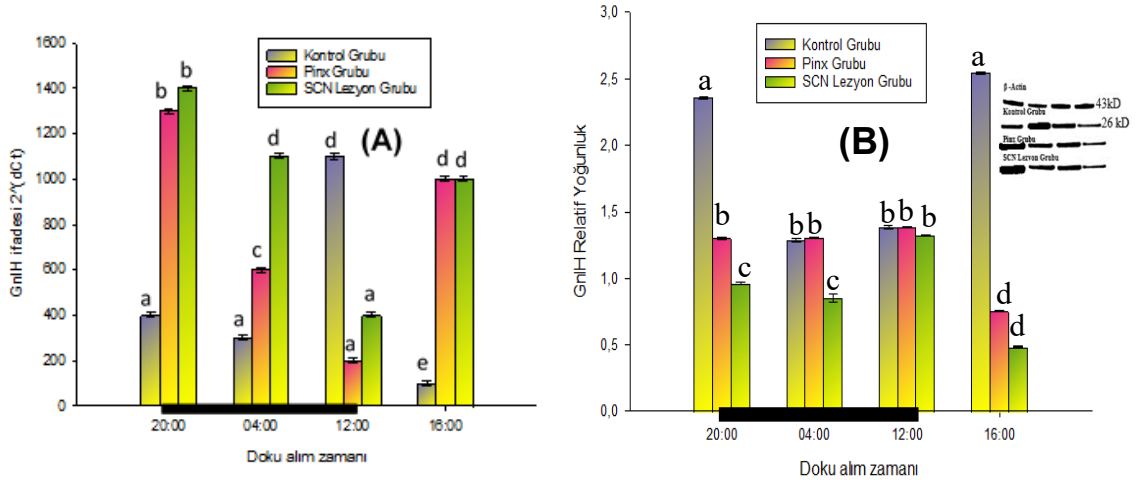
Şekil 13 (A-B)'de 16L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) ait Kisspeptin mRNA ifadeleri ve protein konsantrasyonları gösterilmektedir. Kisspeptin mRNA ifadelerinin kontrol grubunda ışıkların açıldığı anda (04:00) artmaya başladığı ışıkların kapandığı anda (20:00) ise en yüksek noktasına ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 13-A). Bu grupta relatif protein yoğunluğu ise gece yarısı (00:00) grubunda maksimum seviyesine ulaşır iken ışıkların açıldığı anda (04:00) ve gün ortasında (12:00) minimum seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 13-B). Pinealektomili ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan gruplarda Kisspeptin mRNA ifadeleri gece yarısında (00:00) en düşük seviyede tespit edilmiştir (Şekil 13-A). Deney

gruplarının relatif protein yoğunluklarına bakıldığında ise ışıkların kapandığı an (20:00) ve gün ortasında (12:00) artış tespit edilmiştir (Şekil 13-B).



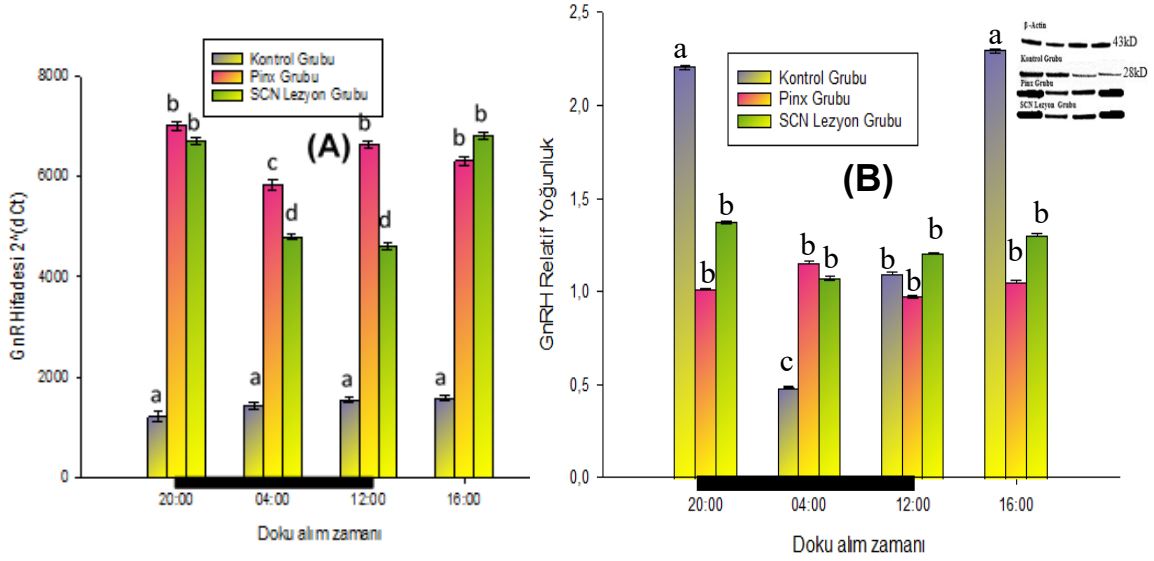
Şekil 13. Uzun fotoperiyotta (16L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 00:00, 04:00 ve 12:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B). Siyah bar karanlık fazı göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir (p<0.05).

Şekil 14 (A-B)'de 8L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) ait GnIH mRNA ifadeleri ve protein konsantrasyonları gösterilmektedir. GnIH mRNA ifadeleri kontrol grubunda ışıkların açıldığı anda (12:00) ile maksimum seviyede tespit edilmiştir. Gün ortasında ise (16:00) en düşük noktada tespit edilmiştir (Şekil 14-A). Bu grupta relatif protein yoğunluğunun ise ışıkların kapandığı an (20:00) ve gün ortası (16:00) grubunda maksimum seviyesine ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 14-B). Pinealektomili ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan gruplarda da GnIH mRNA ifadeleri ışıkların kapandığı anda (20:00) en yüksek seviyesine ulaşmıştır (Şekil 14-A). Deney gruplarının relatif protein yoğunluklarına bakıldığında ise gün ortasında (16:00) belirgin derecede azalış göstermektedir (Şekil 14- B).



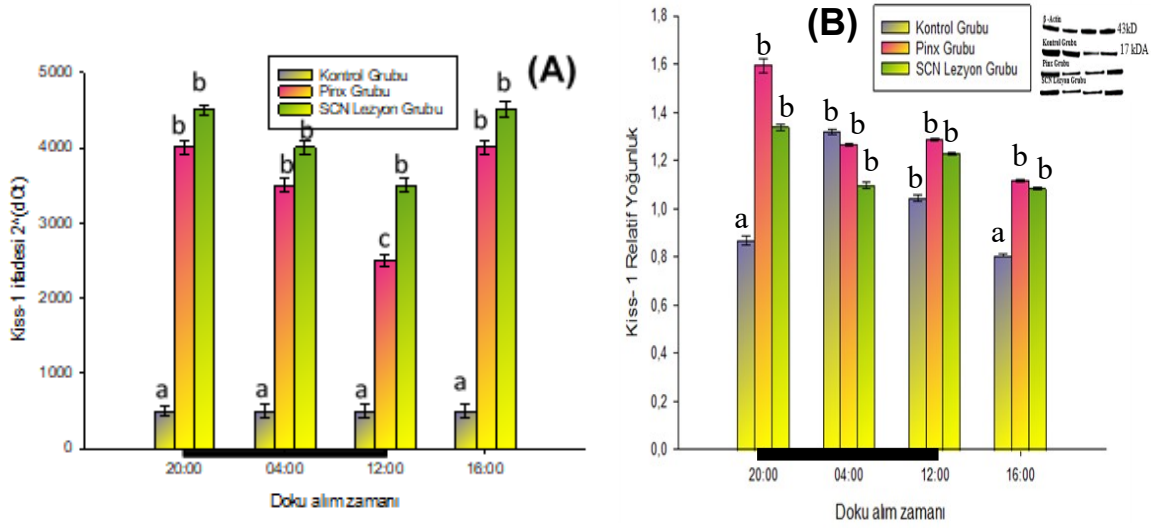
Şekil 14. Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B). Siyah bar karanlık fazı göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir ($p < 0.05$).

Şekil 15 (A-B)'de 8L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 04:00, 04:00 ve 16:00) ait GnRH mRNA ifadeleri ve protein konsantrasyonları gösterilmektedir. GnRH mRNA ifadelerinde kontrol grubunda tüm zaman dilimlerinde düşük seviyede kalarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 15- A). Bu grupta relatif protein yoğunluğu ise ışıkların kapandığı anda (20:00) ve gün ortasında (16:00) maksimum seviyesine ulaşır iken gece yarısında (04:00) yoğunlukta azalma tespit edilmiştir (Şekil 15- B). Pinealektomili ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan gruplarda da GnRH mRNA ifadeleri kontrol grubuna göre tüm zaman dilimlerinde yüksek olarak tespit edilmiştir (Şekil 15- A). Deney gruplarının relatif protein yoğunluklarına bakıldığında ise kontrol grubuna göre ışıkların kapandığı an (20:00) ve gün ortasında (16:00) belirgin derecede azalış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 15-B).



Şekil 15. Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B). Siyah bar karanlık fazı göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir ($p < 0.05$).

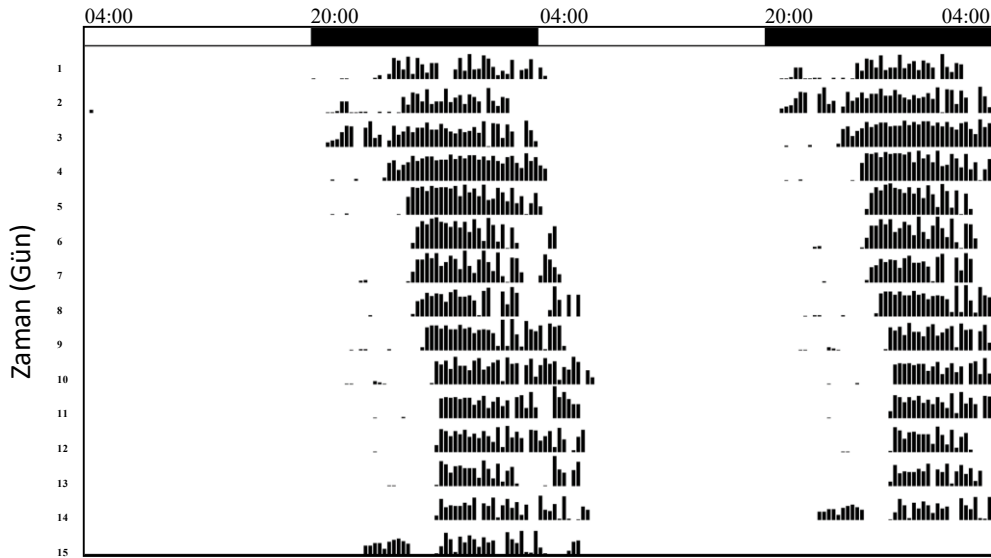
Şekil 16 (A-B)'da 8L fotoperiyodunda bulunan hamsterlerin farklı zaman dilimlerine (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) ait Kisspeptin mRNA ifadeleri ve protein konsantrasyonları gösterilmektedir. Kisspeptin mRNA ifadeleri kontrol grubunda tüm zaman dilimlerinde düşük seyrederek anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 16-A). Bu grupta relatif protein yoğunluğu ise ışıkların kapandığı an ve gün ortasında (20:00; 16:00) minimum seviyede belirlenmiştir (Şekil 16-B). Pinealektomili ve suprakiazmatik nukleus lezyonu yapılan gruplarda da Kisspeptin mRNA ifadeleri tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre yüksek olarak tespit edilmiştir (Şekil 16-A). Deney gruplarının relatif protein yoğunluklarına bakıldığında ise ışıkların kapandığı anda (20:00) artış tespit edilmiştir (Şekil 16-B).



Şekil 16. Kısa fotoperiyotta (8L) erkek Suriye hamsterlerinin (n=20) hipotalamusundan günün farklı saatlerinde (20:00, 04:00, 12:00 ve 16:00) alınan örneklerin mRNA ifadesinin miktarı (A) ve relatif protein yoğunluğunun değişimi (B). Siyah bar karanlık fazı göstermektedir. Aynı harfler istatistiksel benzerliği göstermektedir ($p < 0.05$).

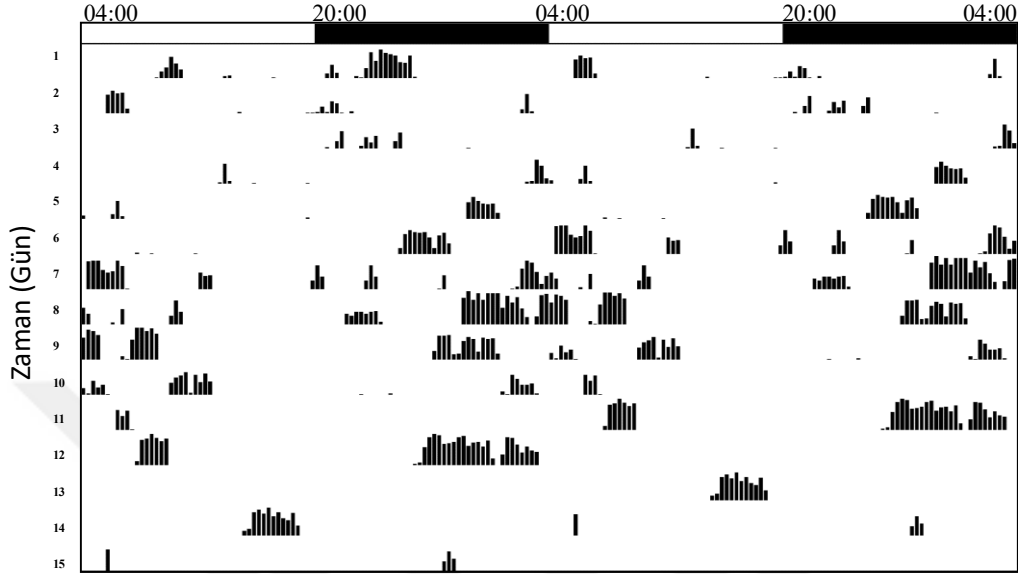
4.3. Lokomotor Aktivite

Şekil 17'de uzun fotoperiyotta kontrol grubuna ait erkek Suriye hamsterinin lokomotor aktivite grafiği yer almaktadır. Hamsterler ışıkların kapanması (20:00) ile aktif hale geçmektedir. Aydınlık faz da (04:00) ise dinlenme halindedir.



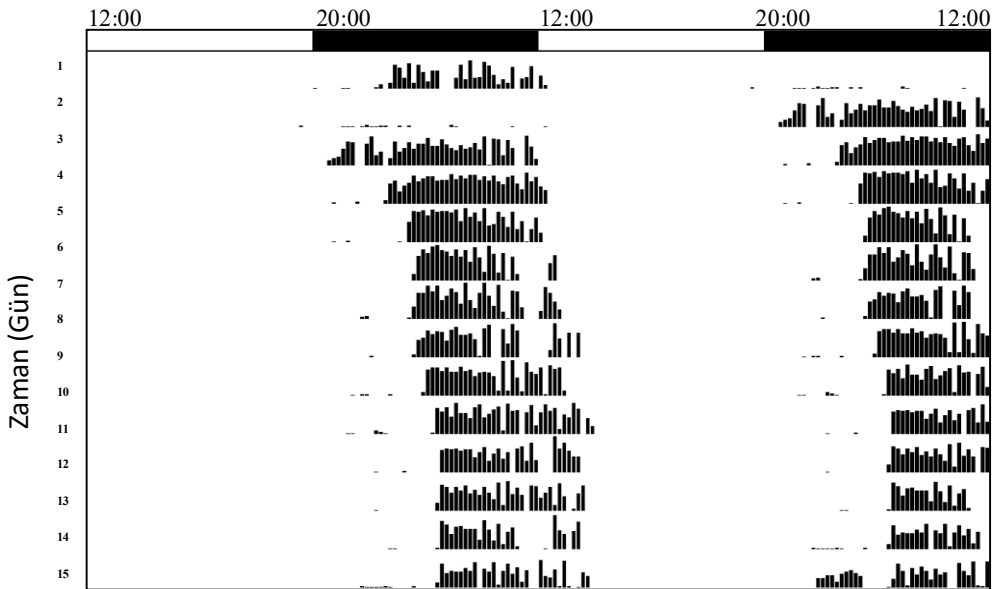
Şekil 17. Kontrol grubu erkek Suriye hamsterlerinin uzun fotoperiyotta (16L) lokomotor aktivitesi.

Şekil 18’de ise uzun fotoperiyotta suprakiazmatik nukleusu lezyon yapılan hamsterlere ait aktivite grafiği yer almaktadır. Bu grupta aritmi aydınlık periyoda doğru faz kayması gözlenmiştir.



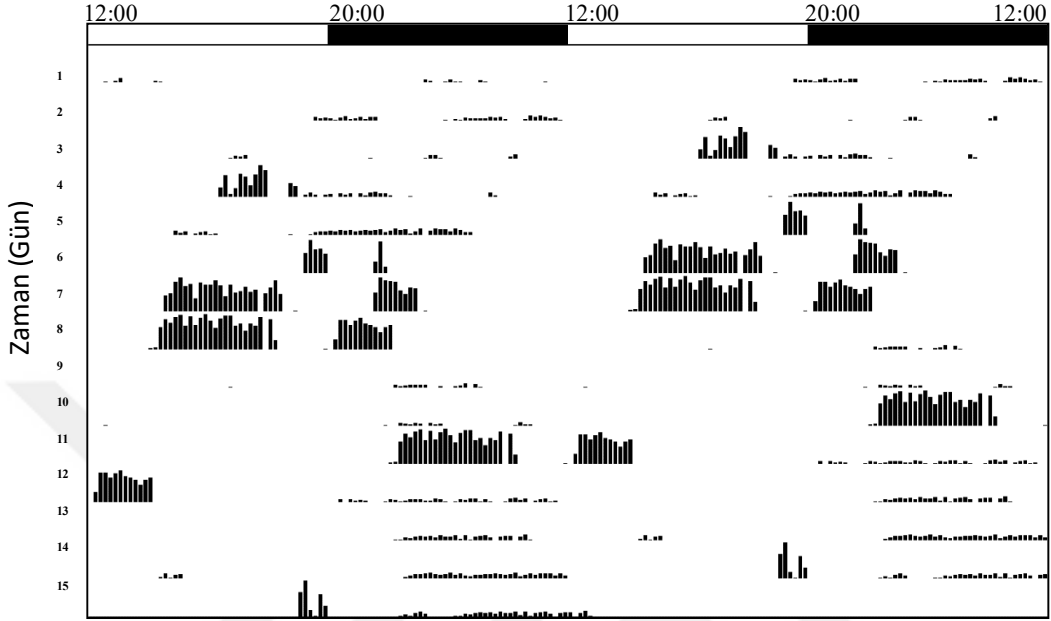
Şekil 18. Beyaz bar aydınlık fazı, siyah bar ise karanlık fazı göstermektedir.

Şekil 19’de kısa fotoperiyotta kontrol grubuna ait erkek Suriye hamsterinin lokomotor aktivite grafiği yer almaktadır. Hamsterler ışıkların kapanması (20:00) ile aktif hale geçmektedir. Aydınlık faz da (12:00) ise dinlenme halindedir.



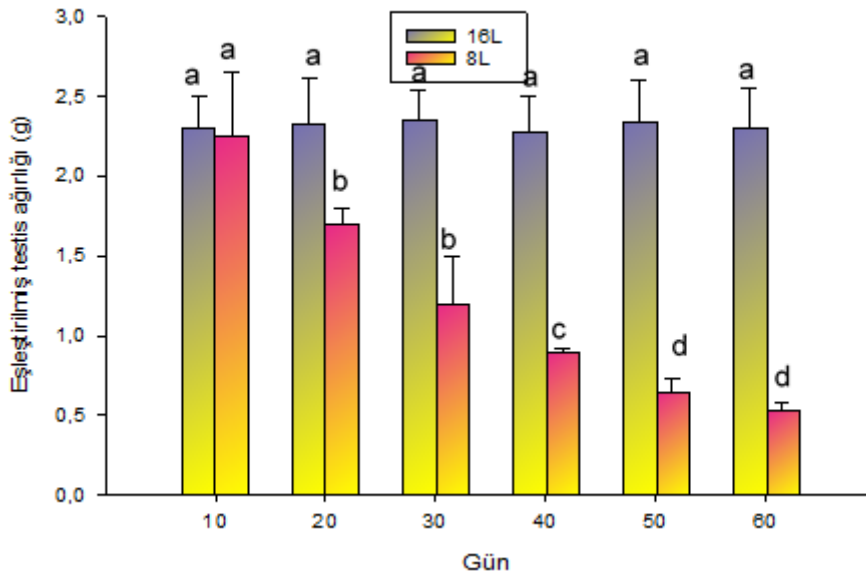
Şekil 19. Kontrol grubu erkek Suriye hamsterlerinin kısa fotoperiyotta (8L) lokomotor aktivitesi.

Şekil 20’de ise kısa fotoperiyotta suprakiazmatik nukleusu lezyon yapılan hamsterlere ait aktivite grafiği yer almaktadır. Bu grupta aritmi aydınlık periyoda doğru faz kayması gözlenmiştir.



Şekil 20. Beyaz bar aydınlık fazı, siyah bar ise karanlık fazı göstermektedir.

Şekil 21’de kısa fotoperiyoda alınan hamsterlerin bu fotoperiyoda cevap verip vermediğini belirlemek amacı ile 60 gün süre ile testis ölçümü yapıldı.



Şekil 21. Erkek Suriye hamsterlerine ait eşleştirilmiş testis ağırlığı grafiği.

4.4. Tartışma

Bu tez çalışmasında üreme ile ilişkili olan melatonin ve leptin hormonlarının yanısıra GnRH, GnIH ve Kisspeptin nöronlarındaki mRNA ve protein değişimlerine bakılmıştır.

16 L ve 8 L koşullarında kontrol gruplarında serum melatonin ve leptin değerlerinin ters orantılı olduğu belirlenmiştir. Serum melatonin seviyeleri fotoperiyoda bakılmaksızın aydınlık fazda düşük, karanlık fazda ise yüksektir. Yüksek melatonin seviyelerinin uzunluğu karanlık faz süresinin uzunluğuna karşılık gelmektedir. Kısa fotoperiyotlarda karanlık süresi uzadıkça melatonin salınma süresi de daha uzun olacaktır. Leptin ise aydınlık fazda yüksek, karanlık fazda düşüktür. Suriye hamsterleri üzerinde yapılan çalışma ile sonuçlarımız uyumludur (Gündüz, 2002). Fakat 16L ve 6L koşullarında Sibirya ve Suriye hamsterlerinde yapılan araştırmada Sibirya hamsterlerinde uzun fotoperiyotta serum leptin seviyesi daha yüksek iken Suriye hamsterlerinde her iki fotoperiyotta da 1 gün boyunca leptin seviyelerinde anlamlı fark olmadığı belirtilmiştir (Horton vd., 2000). Bu farklılık da fotoperiyoda maruz kalmanın uzunluğundan ve türünden, hayvanın yaşından veya hormon ölçüm tekniğinden kaynaklanıyor olabilir.

Memelilerde sirkadiyen saat hipotalamusta suprakiazmatik nukleusta yer almaktadır. Işık, suprakiazmatik nukleus için önemli bir senkronize edicidir. Beynin diğer bölgelerinin uyarılmasını sağlayarak vücut ritimlerinin düzenlenmesini gerçekleştirmektedir (Asher ve Schibler, 2006). Pineal bez, omurgalı hayvanlarda günlük ritimleri kontrol etmede önemli role sahiptir (Arendt, 1988). Salgıladığı melatonin hormonu çevre ile uyum içerisinde olmayı sağlamaktadır. Işık, melatonin hormonunun ritmik salınımını düzenleyen en önemli dış çevresel faktördür. Karanlıkta pineal bez tarafından salgılanan melatonin hormonunun, SCN'nin sirkadiyen etkileri yolu ile üretilerek kan dolaşımına verilmesi bu sonuç için olası bir açıklamadır. Pineal bezinin günlük leptin ritminde inhibe edici rolü olduğu gösterilmiştir (Gündüz, 2002). Melatonin hormonunun yüksek olduğu zaman leptin hormonunun düşük seviyede bulunması, melatoninin leptin hormonunun salınımını düzenleyebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, pineal bezinin inhibe edici işlevi ve SCN'nin etkisi, melatonin ve leptin arasındaki ters orantının nedeni olabilir. Melatonin tüm omurgalılarda benzer olmasına rağmen leptin profilleri aynı ritmik salınımı göstermemektedir. Leptin seviyelerinin sıçanlarda ve insanlarda diurnal ritim gösterdiği; karanlık fazda yüksek aydınlık fazda ise düşük seviyede olduğu ortaya konmuştur (Ahima vd., 1998; Flier, 1998;

Pickavance vd., 1998; Shimokawa ve Higami, 1999; Wolthers vd., 1999). Sibirya hamsterlerinde ise bu ritmik ilişkinin olmadığı belirlenmiştir (Drazen vd., 2000). Melatonin organizmayı günün saati hakkında bilgilendirir iken, leptin metabolizmayı kontrol etmektedir (Reiter, 1993). Leptin, besin alınımını ritmik olarak etkiliyor ise, ilgili organizmaların beslenme ve uyku alışkanlıklarını incelemek de bu nokta da önem kazanmaktadır. İnsanlar diurnal olması nedeni ile aydınlık fazda yeme faaliyetlerini gerçekleştirmektedir. Leptin hormonu dolaşımında kaldığı sürece açlığı bastırmaktadır. Burada leptin melatonin ile karanlık fazda gündüz fazına daha güçlü bir şekilde ilişkilendirilecek, bu da insanların karanlıkta daha az yemek yiyeceği anlamına gelmektedir. Hamsterler ise bu durumun tersini yaşamaktadır. Karanlık fazda leptin seviyeleri düşük olmasına rağmen (Gündüz, 2002), bu hayvanlar geceleri aktiftir ve gündüzleri uyumaktadır. Yani aktif oldukları karanlık fazda besin tüketimleri daha fazladır. Hayvan grupları arasında leptindeki bu ritmik farklılığın ne olduğunu anlamak için leptin reseptörlerinin işlevlerinin incelenmesi gerekmektedir.

16L ve **8L** deney gruplarına yapılan pinealektomi ve SCN lezyon operasyonları sonucunda serum melatonin ve leptin seviyelerine bakıldığında günlük ritmin kaybolduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz deneysel verilerimiz yapılmış olan önceki çalışmalar ile uyumludur (Choi ve Han, 2010; Gündüz, 2002; Karakaş ve Gündüz 2006; Kuş vd., 2004). Pinealektomi uzun fotoperiyoda ilişkin üreme sinyallerinin ortadan kalkmasını sağlamaktadır (Kelly vd., 1995; Whitten vd., 1993). Pinealektomi yapıldığında fotoperiyoda bakılmaksızın karanlıkta yüksek olan melatonin seviyesinin aydınlık faz ile aynı seviyeye inmesine sebep olmuştur. Böylece pineal bezin yokluğunda oluşan üreme fonksiyonlarındaki düzensizlik pineal bezinin fotoperiyodun etkilerini üreme sistemine ilettiğini ve eşeyssel aktiviteleri düzenlediğini anlayabilmekteyiz. Pineal bezin çıkarılma zamanı önemlidir. Çünkü uzun fotoperiyotta tutulan hayvanın pineal bezi alınıp kısa fotoperiyoda konulduğunda, üreme sistemi uzun fotoperiyot koşullarına göre devam etmektedir. Yani bir anlamda hayvanın pinealektomi öncesi bulunduğu ışık bilgisini endokrin/ üreme sisteme yansıttığını görebiliyoruz (Gündüz ve Stetson, 1994; Karakaş ve Gündüz, 2002). Bundan dolayı melatonin seviyesi düşük olsa dahi hayvanlarda pineal bezinin çıkarılması ile üreme işlevinin sürdürüldüğünü görebilmekteyiz. SCN lezyonunun hamsterlerde lokomotor aktivite, besin alınımı gibi endojen günlük ritimlerin ortadan kalkmasına neden olduğu belirlenmiştir (Abe vd., 1979; Bethea ve Neil, 1980; Canpolat vd., 2001; Kittrell, 1991; Moore ve Eichler, 1972; Moore ve Klein, 1974; Refinetti vd., 1994).

SCN'nin, sıçandaki kortikosteron, insülin ve beslenme ritimlerinden bağımsız olarak serum leptin düzeylerinin günlük ritmini doğrudan kontrol ettiği belirtilmiştir (Kalsbeek vd., 2001). Ayrıca, SCN, sempatik sinir sistemi aracılığı ile nöronal çıktısı yoluyla beyaz yağ dokusunu kontrol edebilir (Bartness vd., 2001). Bu nedenle, SCN'nin yağ dokusunu nöronal mekanizmalarla mı yoksa ritmik melatonin salınımlarıyla mı kontrol ettiği net değildir.

Gece (doğal karanlık) melatoninin yıllık/fotoperiyodik döngüsünün üremeyi mevsimsel olarak senkronize etmek için gerekli olduğu bilinmektedir (Hoffman ve Reiter, 1965; Reiter vd., 2009; Whitten vd., 1993). Yıl boyunca üreme aktivitesini düzenlemek için melatoninin hangi hücresel bölgelere etki ettiği ve beyinde hangi reseptörel yolları kullandığı hala açık değildir. Çok sayıda beyin bölgesinin melatonin bağlama bölgeleri içerdiği bulunmuştur, ancak önemli tür farklılıkları vardır (Masson-Pévet vd., 1996; Nosjean vd., 2001). Araştırmalara göre hipotalamusun medial bazal kısmı melatoninin üreme üzerindeki etkilerine aktif olarak katkıda bulunmaktadır (Williams vd., 1995). Üreme aktivitesinin ana düzenleyicileri Kisspeptin ve GnIH, melatoninin üreme sistemini etkileme şekline yeni boyutlar kazandırmıştır. GnRH, Kisspeptin ve GnIH, türler arasında fotoperiyot veya melatoninin neden olduğu gonadal durgunlukta öngörülebilir değişiklikler göstermekte ve bu nöropeptitlerin mevsimsel üremede önemli roller oynadığına işaret etmektedir. Bu peptitlerin melatonin ve leptin üzerindeki günlük ritmik varyasyonları, mevsimsel olarak üreyen diğer hayvanlarda fotoperiyodun bu nöropeptitler üzerindeki etkileri üzerine araştırmalara rağmen çalışılmamıştır.

GnRH, üreme ile ilgili iç ve dış çevreden gelen uygun uyarıların son ortak yolunu temsil etmektedir (Bronson, 1989; Uenoyama vd., 2016). GnRH nöronları hipofiz gonadotropinlerinin salınımını uyararak gametogenez ve eşey üreme hormonlarının (steroid) salınımını düzenlemektedir (Plant, 2015; Uenoyama vd., 2016). Kısa gün uzunluğu GnRH salınımını inhibe etmekte ancak üretimini engellememektedir, böylece kısa gün Suriye hamsterlerinde GnRH immünoreaktif nöronların arttığı gösterilmiştir (Ronchi vd., 1992). Ancak Sibirya hamsterlerinde uzun gün ile karşılaştırıldığında bir fark tespit edilememiştir (Yellon, 1994). Memelilerde GnRH peptitlerinin biyolojik fonksiyonlarına ilişkin bilgiler hala azdır. GnRH mRNA düzeylerini incelediğimizde özellikle ışık geçişlerinde (ışıklar açılıp kapandığında) yükseldiğini, diğer zamanlarda ise hem aydınlık hem de karanlık fazlarda düştüğünü belirledik. Ancak peptit salınımı diğer zamanlara göre özellikle karanlık

fazda ve ışıkların kapatıldığı anlarda daha fazladır. Deney gruplarında da ışıkların kapandığı anda ve aydınlık fazda artış göstermiştir.

Diğer iki hipotalamik nöropeptit olan kisspeptin ve RFamide ailesinden olan gonadotropin inhibe edici hormonun (GnIH) üreme fonksiyonları üzerine anahtar rol oynadığı bulunmuştur (Mason vd., 2007; Simonneaux vd., 2013). Bu tez çalışmasında, GnIH (RFRP-3) mRNA seviyelerinin, karanlık fazda daha düşük ifade ile ışığa bağımlı olduğu belirlenmiştir. Deney gruplarında ise mRNA seviyesinin aydınlık fazda en yüksek olduğu belirlenmiştir. İnsan RFRP geni, GnIH peptidinin gonadotropin sekresyonu üzerindeki inhibitör aktivitesi ile ilişkili olan kuş GnIH genine ortologdur (Johnson vd., 2007; Tsutsui vd., 2000). Memelilerde GnIH, GnRH nöronları yoluyla dolaylı olarak gonadotropin salınımını etkileyebilir. Suriye hamsteri de dahil olmak üzere birçok kemirgen çalışmasında, bu sinirlerin bağlandığı GnRH hücrelerinin sayısına kıyasla, medyan eminensin dış tabakasında çok az GnIH-immunreaktif hücre bulunmuştur (Johnson vd., 2007). Memelilerde RFRP-3 (RFamide-ilişkili peptid- 3) geni mediobasal hipotalamusta bulunan nöronlarda ifade olmaktadır (Kriegsfeld vd., 2006; Revel vd., 2008). RFRP nöronları beyinde Arkuat nükleus (ARC) ve preoptik bölge (POA), anterior hipotalamusa gidebilmektedir (Mason vd., 2010; Ukena ve Tsutsui, 2001). RFRP-3 fotoperiyodik olmayan birçok türde üreme eksenini inhibe edici özelliğe sahiptir (Kriegsfeld vd., 2006; Ubuka vd., 2012). İlginç bir şekilde üremenin aktif olmadığı zaman (kısa-gün uzunluğunda) RFRP-3'ün eksojen olarak verilmesi üreme davranış ve fizyolojisini uyardığı saptanmıştır (Ancel vd., 2012; Mason vd., 2010; Revel vd., 2008; Ubuka vd., 2012). Bu tez çalışmasında, kısa fotoperiyotta gün ortasında GnIH mRNA seviyesinin azalma gösterir iken, deney gruplarında ise anlamlı derecede artış göstermektedir. Relatif yoğunluğu ise aynı zaman diliminde kontrol ve deney gruplarında ters ilişkili olarak tespit edilmiştir. Bu fotoperiyotta GnRH mRNA düzeyine bakıldığında ise kontrol grubunda tüm zaman dilimlerinde anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir. Deney grupları da tüm zaman dilimlerinde artış göstermiştir. Kontrol grubuna ait relatif yoğunluğunun ise karanlık fazda azaldığı belirlenmiştir.

Öte yandan, GnIH'nin hipofiz seviyesinde ve/veya GnRH salınımı yoluyla LH salınımını etkileyip etkilemediği bilinmemektedir. Bunun ya doğrudan GnIH ve GnRH nöronal bağlantıları yoluyla ya da dolaylı olarak arkuat nükleusdaki kisspeptin nöronlarına bağlantılar yoluyla gerçekleştiği tahmin edilebilir. Kisspeptin ve GPR54'ün GnRH nöronlarının da pubertal aktivasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Funes vd.,

2003). Kisspeptin nöronlarının olmaması ya da herhangi bir sebeple GnRH salınımının inhibe edilmesi pubertal gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir (de Roux vd., 2003). Ayrıca kisspeptinin üremedeki fonksiyonu insanlardaki idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm hastalığında kisspeptin reseptöründeki (Kissr) mutasyon ile keşfedilmiştir (de Roux vd., 2003).

Diğer taraftan Kisspeptin hem kısa hemde uzun fotoperiyotlarda gonadotropin salınımını uyarmaktadır (de Roux vd.,2003; Han vd., 2005). Kisspeptin nöronlarının çoğu anteroventral periventriküler nukleus bölgesinde (AVPV) ve arkuat nukleus bölgesinde (ARC) bulunmaktadır (Lehman vd., 2010). Erkek Suriye hamsterlerinde kısa gün uzunluğu ya da uzun süreli melatonin infüzyonu ARC' de kisspeptin mRNA seviyesini ve kisspeptin-pozitif hücre sayısını düşürmektedir. Bu etki pinealektomi ile ortadan kaldırılmaktadır (Revel vd., 2006; Simonneaux vd., 2012). Erkek ve dişi Sibirya hamsterlerinde ise kısa fotoperiyotta kisspeptin AVPV bölgesinde düşmekte ve ARC' de ise artmaktadır. Uzun güne maruz bırakılan hayvanlarla karşılaştırıldığında (Mason vd., 2007) inaktif olan erkek Suriye hamsterlerinde kisspeptin uygulaması üreme sistemini tekrar aktive etmektedir (Ansel vd., 2011; Revel vd., 2006). KiSS1 ve Kiss1r “knock out” farelerde üreme ile ilişkili seksüel davranışta azalma, infertilite ve pubertal gelişmede gecikme gibi benzer fenotipler ortaya çıkmıştır (d'Anglemont de Tassigny vd., 2007). Kisspeptin üreme ekseninde gonadotropin salgılatıcı (GnRH) nöronları uyararak direk olarak gonadotropin salgılamasıyla üremeyi düzenler. Özellikle kisspeptin nöronları Preoptik alan (POA) ve Median eminensia (ME) bölgesinde GnRH nöronlarına projeksiyon yapar (Clarkson ve Herbison, 2006) ve GnRH nöronlarının %60-90' ı Kiss1r ifade eder (Herbison vd., 2011). Ayrıca Kisspeptin GnRH, LH ve FSH salınımını arttırmasını GnRH mRNA ekspresyonunu ve salgılanmasını GnRH-salgılatıcı nöronların hücre hattını uyararak yapar (Han vd., 2005; Liu vd., 2008). Bu çalışmalar Kisspeptinin üreme eksenindeki kontrolünü GnRH nöronlarını düzenlemesiyle yaptığını açıklamaktadır. Birçok çalışma anteroventral periventriküler nukleus bölgesinde (AVPV) bulunan kisspeptin nöronlarının östrojen salgılanmasını pozitif yönde etkilerken, Arkuat nukleus (ARC) bölgesinde bulunan kisspeptin nöronlarının ise östrojen salınımını düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır (Han vd., 2005; Smith vd., 2007). Gonadektomi yapılan farelerde AVPV bölgesinde KiSS1 mRNA seviyesi azalırken, ARC bölgesinde KiSS1 mRNA seviyesinde artma olduğu yapılan çalışma ile ortaya koyulmuştur. Bu değişimin ayrıca seks steroidlerinin değiştirilmesi ile tersine dönüştürüldüğü gösterilmiştir (Smith vd., 2007). Çalışmamızda, aydınlık faza geçiş ile

birlikte Kiss-1 mRNA ifadesinin arttığı, deney gruplarında da aynı artışın meydana geldiğini belirledik. Kısa fotoperiyotta ise kontrol grubunda tüm zaman dilimlerinde Kiss-1 mRNA ifadesi aynı düzeylerde tespit edilmiştir. Deney gruplarında ise kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerde belirlenmiştir.

Her iki peptit de beslenmeyi düzenleyici özelliklere sahip olabilir. Çoğu türde, negatif enerji dengesi, puberte başlangıcını geciktirerek veya yetişkinlerde üreme işlevinin aksamasına neden olur. Metabolik durumla ilgili bilgi, leptin gibi periferik organlar tarafından üretilen dolaşımdaki faktörler aracılığıyla üreme eksenine iletilir. Üreme eksenindeki konumları nedeniyle, Kiss1 nöronlarının metabolik duruma duyarlı olabileceği ve bu bilgiyi HPG ekseninin alt bileşenlerine iletebileceği varsayılır. Eğer öyleyse, Kiss1'in açlık veya metabolik hormonlar tarafından düzenlenmesi beklenir (Gaytan vd., 2009). Aç kalma hipotalamik kisspeptin mRNA ifadesinin düşmesine ve GnRH salınımının azalmasına sebep olur (Brown vd., 2001; Castellano vd., 2005). Kiss1r ekspresyonunu azalttığı da gösterilmiştir (Luque vd., 2007). Leptin, vücuttaki enerji depolarının miktarı ile orantılı olarak beyaz yağ dokusundan salgılanır ve tokluk faktörü olarak işlev görür (Özata vd., 2003). Leptin eksikliği olan (ob/ob) fareler, ARC'de leptin tedavisi ile kısmen tersine çevrilebilen azalmış Kiss1 mRNA seviyeleri göstermiştir (Smith vd., 2006).

Vardığımız sonuç birkaç nedenden dolayı şaşırtıcı görünebilir, ancak GnIH ifadesinin karanlık fazda mRNA seviyesinde azaldığını ancak peptit seviyesinde olmadığını bulduk. İlk olarak, eğer GnIH'nin birincil işlevi gonadotropik eksenini bloke etmek olsa idi, ifadesinin karanlık faz sırasında artacağını ve aynı anda kisspeptin tarafından temsil edilen pozitif yönde eğilimi azaltırken üreme için negatif yönde eğilimi artıracığını ön görebilirdik. Bir hipotez de GnIH'nin hamsterlarda hipotalamo-hipofiz-gonadal eksenin aktivitesini düzenlediğidir. Bu, doğrudan GnRH nöronları üzerinde veya kisspeptin nöronları veya diğer araçlar aracılığıyla olabilir. Kisspeptinin GnRH salınımının bir uyarıcı olarak büyük etkinliği göz önüne alındığında, bu seçenek özellikle alakalı olmaktadır. Ancak GnIH'nin hem kuşlarda hem de hamsterlardaki rolünü düşündüğümüzde sonuçlar farklı yorumlanabilmektedir. Bildiriciler ve Suriye hamsterleri her ikisi de uzun gün üreyen canlılar iken, fotoperiyodun her iki hayvan türünde üreme üzerine farklı etkileri vardır. Karanlık faz sırasında GnIH ekspresyonundaki azalma, GnIH'nin bir gonadotropin inhibe edici faktör olarak işlevi hakkında birkaç sorunu da gündeme getirmektedir. GnIH peptitlerinin biyolojik etkileri, sadece üreme aktivitesini düzenlemenin ötesine geçebilir. Ek

olarak, GnIH mRNA seviyesinin düzenlenmesini GnIH olarak salınma zamanından uygun şekilde ayırt etmek önemlidir. Daha fazla araştırma gereklidir, ancak melatoninin GnIH gen ekspresyonunu azaltabilmesine rağmen, mRNA ve peptitlerin nasıl düzenlendiği konusunda bir fark olabileceği anlamına gelir. Fotoperiyot, mevsimsel olarak üreyen hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda GnIH ekspresyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Ancak bizim yaptığımız gibi GnIH ve GnRH'nin günlük ritmik değişikliklerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, türler arasında farklılıklar vardır. Hamsterlerin aksine, testis fonksiyonunda fotoperiyodik değişiklik göstermeyen Wistar sıçanlarında gün uzunluğunun GnIH ifadesi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Bu bulgular, fotoperiyodun mevsimsel türlerde GnIH ifadesini özel olarak değiştirdiğini ima etmektedir.

Kisspeptin ve reseptörünün puberte başlangıcı, üreme sisteminin gelişimi ve devamlılığı için önemli bir fonksiyona sahip olmakla beraber türler arası görev ve lokalizasyon farklılıklarının olması çalışmaları zorlaştırmaktadır. Aynı durum GnIH için de söylenebilir. Farklı memeli türlerinin hipotalamuslarında nöronların yoğunlaştıkları alanların, uzantılarının yoğunluklarının tespit edilme ve tanımlanma farklılıkları kullanılan işaretleme metodlarının duyarlılığı ya da kullanılan antikörlerin özelliğinden de kaynaklanıp kaynaklanmadığı da önemli olmaktadır.

Peptidler arasında görülen mRNA sentezi ile ilgili peptidlerin salınım farklılıkları bunları üreme sistemi üzerinde ki pulsatil etkilerinden kaynaklanabilir. Özellikle GnRH nöronları üzerinde ki Kisspeptin ve GnIH nöronlarının etkileri, erkek ve dişilerde farklı olmakla birlikte gerek pulsatil ve gerekse de ani salınım (surge) davranışları ile ilişkilendirilebilir. Bu manada bir nöronun mRNA seviyesinin yüksek olması zamanlamaya bağlı olarak bunun ürünü olan hormon ya da ilgili ürünün yüksek olması anlamına gelmeyeceğidir.

Kisspeptinin ritmik salınımının GnRH ile olan ilişkisinin gerçek zamanlı gösteriminde genelde LH hormonun da ki artış ya da azalışa göre bir ilişki ortaya konmakla beraber bizim çalışmamızda LH ölçümü yapılmadığı için bu durumu göz önüne almadık.

Kisspeptin, doğrudan GnRH sistemine sinyal gönderebilir: kemirgenlerdeki GnRH hücrelerinin çoğu, kiss1 reseptörleri ifade eder ve kisspeptin lifleri, GnRH nöronları ile yakından ilişkilidir. Diğer taraftan türler arasında da farklılıktan dolayı kisspeptin in doğrudan GnRH ile ilişkili olmayan durumları da söz konusudur. Bu durumda Kisspeptin, metabolik fonksiyon ve enerji harcamasının kontrolüne doğrudan katılmasa da, hipotalamik

kisspeptin sisteminin GnRH nöronlarına metabolik bilgi iletmede anahtar bir rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır.

Adiposit kaynaklı hormon leptinin, üreme işlevini düzenleyen kisspeptin sisteminde çok önemli bir rol oynaması muhtemeldir. Farede, ARC ve POA'daki kisspeptin hücreleri, leptin reseptörünün sinyal formunu ifade eder ve leptin, doğrudan kisspeptin sistemi üzerinde veya proopiomelanokortin/nöropeptit Y (POMC/NPY) nöronları gibi kisspeptin hücrelerine giden afferent yolların modülasyonu yoluyla dolaylı olarak etki edebilir.

Kisspeptin sisteminin, gen ekspresyonunu değiştirerek POMC/NPY nöronlarını etkilemesi, bu sayede Kisspeptin hücrelerinin iştah düzenleyici nöronları modüle edebilmesi ve dolaylı olarak GnRH sekresyonunu kontrol edebildiği düşünülmektedir.

Genel olarak, koyunlarda ve mevsimsel üreyen kemiricilerde yıllık üreme döngülerinin, nöroendokrin sistemde ışık aracılı değişiklikler ve bunların GnRH sekresyonu ve GnRH reseptörünün (GnRHR) gen ekspresyonunu kontrol etmedeki mekanizmaları düşünüldüğünde ışık sinyallerin GnRH hücrelerine geçişinden sorumlu nöral mekanizmaları nasıl çalıştırdığı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Birikmiş kanıtlar, hipotalamusun türe özgü bölgelerinde yer alan kisspeptin nöronlarının, hayvanların farklı fizyolojik durumları sırasında GnRH/LH salgılanmasının uyarılması ve/veya engellenmesinde rol oynadığını göstermektedir. Kisspeptin nöronlarının hipotalamustaki GnRH aktivitesi üzerindeki etkisi çok faktörlüdür ve büyük ölçüde steroid hormonlarına, çeşitli peptidlere ve metabolik sinyallere bağlıdır.

Leptin ve insülin gibi hormonlar metabolizmayı ve üremeyi, beslenmeyi, vücut ağırlığını ve gonadotropin salgılanmasını etkiler. Mevcut kanıtlar, leptin ve insülinin farklı olarak, kisspeptinin metabolizmanın veya vücut ağırlığının düzenlenmesinde doğrudan bir rol oynamadığını göstermektedir. Çalışmamızda hayvanların gerek besin tüketimlerinde ve gerekse de vücut ağırlıklarında bir değişim gözlemlenmedi.

Fotoperiyodun Kiss1 ifadesi üzerindeki etkilerine Suriye hamsterinde melatonin aracılık ediyor olabilir. Pinealektomi, kısa fotoperiyot hayvanlarında Kiss1 mRNA'nın aşağı regülasyonunu (ve üreme inaktivasyonunu) önlemektedir (Şekil-16).

Pinealektomi aracılığı ile melatonin uzaklaştırılmasının bu sonuçları verdiği, melatonin verilmesi ile doğrulanmayı beklemektedir. Melatonin Kiss1'i düzenliyorsa,

melatoninin doğrudan Kisspeptin nöronları üzerinde, ara hedefler (nöronlar) aracılığıyla mı yoksa her ikisi aracılığıyla mı etki ettiğini belirlemek önemlidir.

Çalışmamızda gün içerisinde GnIH, GnRH ve Kisspeptin gen ve proteinlerinin ritmik değişimlerini tespit ettik. Araştırmalar henüz emekleme aşamasında olmasına rağmen, memeli türlerinde çok sayıda elde edilen kanıt, GnIH ve kisspeptin'in HPG ekseninin kilit birer düzenleyicileri olduğunu gösteriyor. Bugüne kadar incelenen tüm türlerde, doğrudan veya dolaylı kanıtlar GnIH ve kisspeptin'in GnRH sistemi seviyesinde ve hipofiz gonadotropoları üzerinde bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu etkileşimde melatonin ve leptin hormonlarının rolleri tartışmalı olsa da leptinin üremeden ziyade metabolik yollarda daha etkili olduğu yönünde bulgular artmaktadır.



BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda erkek Suriye hamsterlerinde puberteye erişim ve üreme sisteminin çalışmaya başlamasında etkili olan GnRH nöronlarının ve ilişkili GnIH ve Kisspeptin nöronlarında meydana gelen değişimlerin (pinealektomi ve suprakiazmatik nukleus lezyonu ile) üremeyi nasıl etkilediğini karşılaştırılmalı olarak ilk kez açıklanmıştır.

Leptin hormonunun düşük olduğu karanlık fazda, kisspeptin mRNA ekspresyonunun düşük ancak peptid salınımının yüksek olduğunu tespit ettik. Bu özellik Suriye hamsterlerinde bulunur iken, kisspeptin ile leptin arasındaki doğrusal ilişkinin sıçan ve fare gibi türlerde daha belirgin olduğu bilinmektedir. Bulgularımızın tüm hayvanlarda benzer mekanizmaları etkileyeceğini iddia edemeyiz. Örneğin, melatonin, leptin, GnIH, GnRH ve kisspeptin arasındaki tüm ilişkilerin üreme değil, metabolik nitelikte olduğunu ifade eder. Ayrıca, örneğin, kisspeptin ifadesinin günlük düzenlenmesi, karmaşık ve türe bağlı görünmektedir.

Omurgalıların mevsimsel üreme mekanizmaları uzun zamandır gizemini korumaktadır; bununla birlikte, son karşılaştırmalı çalışmalar, çeşitli omurgalı türlerinde mevsimsel üremeyi düzenleyen sinyal iletim yollarını ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmaların sonuçları, bu fotoperiyodik mekanizmaların evrenselliğini ve çeşitliliğini ortaya koymuştur. İlgili moleküller (GnRH, GnIH, Kisspeptin ve ilgili hormonlar) bu sistem içerisinde korunur, ancak bu mevsimsel etkilerden sorumlu dokular/organlar farklı görünmektedir.

Sonuç olarak GnIH, GnRH ve kisspeptinin günlük ritimleri ile melatonin ve leptin hormonları ile ilişkilerinin belirlenmesi alanında bir ilk olup, bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Abe, K., Kroning, J., Greer, M. A., and Critchlow, V. (1979). "Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin." *Neuroendocrinology*, 29(2), 119-131.
- Abrahamson, E. E. and Moore, R. Y. (2001). "Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections." *Brain Research*, 916 (1-2), 172-191.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C. ... Reiter, R. J. (2014). "Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions." *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71 (16), 2997-3025.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., et al., (1996). "Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting." *Nature* 382, 250–252.
- Akbay, G. D. (2020). "Sirkadiyen ritim ve obezite." *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5 (2), 83-90.
- Alotaibi, M. F. (2019). "Physiology of puberty in boys and girls and pathological disorders affecting its onset". *Journal of Adolescence*, 71, 63-71.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R. and Guillemin, R. (1971). "Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44 (1), 205-210.
- Ancel, C., Bentsen, A. H., Sebert, M. E., Tena-Sempere, M., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V. (2012). "Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: The exception proves the rule." *Endocrinology*, 153 (3), 1352-1363.
- Ansel, L. (2010). A Kiss for the seasonal control of reproduction (Doctoral dissertation, Strasbourg).
- Ansel, L., Bolborea, M., Bentsen, A. H., Klosen, P., Mikkelsen, J. D., and Simonneaux, V. (2010). "Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters." *Journal of Biological Rhythms*, 25(2), 81-91.
- Ansel, L., Bentsen, A. H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J. D., and Simonneaux, V. (2011). "Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced

- gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GnRH release". *Reproduction*, 142(3), 417.
- Arendt J., (1988). "Melatonin." *Clinical Endocrinology*, 29, 205-229.
- Arendt, J. (2000). "Melatonin, circadian rhythms and sleep." *The New England Journal of Medicine*, 343, 1114-6.
- Asher, G., and Schibler, U. (2006). "A CLOCK-less clock." *Trends in cell biology*, 16(11), 547-549.
- Atcha, Z., Cagampang, F. R. A., Stirland, J. A., Morris, I. D., Brooks, A. N., Ebling, F. J., ... and Loudon, A. S. (2000). "Leptin acts on metabolism in a photoperiod-dependent manner, but has no effect on reproductive function in the seasonally breeding Siberian hamster (*Phodopus sungorus*)." *Endocrinology*, 141(11), 4128-4135.
- Bakker, J., Pierman, S. and Gonzalez-Martinez, D. (2010). "Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones." *Hormones and Behavior*, 57 (4-5), 390-395.
- Bakker, J., Rubin, B. S. and Baum, M. J. (1999). "Changes in mediobasal hypothalamic gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels induced by mating or ovariectomy in a reflex ovulator, the ferret." *Endocrinology*, 140 (2), 595-602.
- Barnard, C. S. and Dockray, G. J. (1984). "Increases in arterial blood pressure in the rat in response to a new vertebrate neuropeptide, LPLRFamide, and a related molluscan peptide, FMRFamide." *Regulatory Peptides*, 8 (3), 209-215.
- Bartness, T. J., Song, C. K., and Demas, G. E. (2001). "SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms." *Journal of Biological Rhythms*, 16(3), 196-204.
- Bethea, C. L., and Neill, J. D. (1980). "Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat". *Endocrinology*, 107(1), 1-5.
- Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C. ... Desoye, G. (2004). "Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts." *Journal of Cell Science*, 117 (8), 1319-1328.
- Bliss, S. P., Navratil, A. M., Xie, J. and Roberson, M. S. (2010). "GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility". *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31 (3), 322-340.

- Boggio, V., Cutrera, R., Carbone, S., Scacchi, P., and Ponzo, O. J. (2013). "Leptin inhibits the reproductive axis in adult male Syrian hamsters exposed to long and short photoperiod." *Reproductive Biology*, 13(3), 203-208.
- Borjigin, J., Li, X., and Snyder, S. H. (1999). "The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 53-65.
- Bronson, F. H. (1989). "Mammalian reproductive biology." *University of Chicago Press*.
- Brown, D. I., Garyfallou, V. T., and Urbanski, H. F. (2001). "Photoperiodic modulation of GnRH mRNA in the male Syrian hamster". *Molecular Brain Research*, 89(1-2), 119-125.
- Brzezinski, A. (1997). "Melatonin in humans". *New England Journal of Medicine*, 336(3), 186-195.
- Buijs, R. M. and Kalsbeek, A. (2001). "Hypothalamic integration of central and peripheral clocks". *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (7), 521-526.
- Buijs, F. N., Guzmán-Ruiz, M., León-Mercado, L., Basualdo, M. C., Escobar, C., Kalsbeek, A., and Buijs, R. M. (2017). "Suprachiasmatic nucleus interaction with the arcuate nucleus; essential for organizing physiological rhythms." *eNeuro*, 4(2).
- Canpolat, S., Sandal, S., Yilmaz, B., Yasar, A., Kutlu, S., Baydas, G., and Kelestimur, H. (2001). "Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum leptin levels in male rat." *European Journal of Pharmacology*. 428: 145–148.
- Castellano, J. M., Navarro, V. M., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., ... and Tena-Sempere, M. (2005). "Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition." *Endocrinology*, 146(9), 3917-3925.
- Chakir, I., Dumont, S., Pévet, P., Ouarour, A., Challet, E., and Vuillez, P. (2015). "Pineal melatonin is a circadian time-giver for leptin rhythm in Syrian hamsters." *Frontiers in Neuroscience*, 9, 190.
- Chakir, I., Tournier, B. B., Touati, H., Poirel, V. J., Challet, E., Pevet, P., ... and Vuillez, P. (2021). "Pinealectomy and gonadectomy modulate amplitude, but not photoperiodic modulation of Clock gene expression in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei". *European Journal of Neuroscience*, 53(11), 3612-3620.
- Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S. ... Vaudry, H. (2003). "Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide

- family with orexigenic activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15247-15252.
- Choi, D. (1996). “Reproductive physiology of pineal hormone melatonin.” *The Korean Journal of Zoology*, 39, 337-351.
- Choi, D. C., and Han, E. H. (2010). “The impacts of photoperiods on hypothalamic proteins in the reproductive activities of golden hamsters.” *Development and Reproduction*, 14(3), 185-197.
- Chowdhury, V. S., Yamamoto, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., Hattori, A. and Tsutsui, K. (2010). “Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus”. *Endocrinology*, 151 (1), 271-280.
- Clarke, I. J. and Cummins, J. T. (1982). “The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes”. *Endocrinology*, 111 (5), 1737-1739.
- Clarke, I. J. and Pompolo, S. (2005). “Synthesis and secretion of GnRH”. *Animal Reproduction Science*, 88 (1-2), 29-55.
- Clarke, I. J., Sari, I. P., Qi Y, Smith, J. T., Parkington, H. C., Ubuka, T. ... Bentley, G. E. (2008). “Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion”. *Endocrinology*, 149 (11), 5811-5821.
- Clarkson, J., and Herbison, A. E. (2006). “Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty.” *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254, 32-38.
- D’Occhio, M. J., Campanile, G. and Baruselli, P. S. (2020). “Peripheral action of kisspeptin at reproductive tissues-role in ovarian function and embryo implantation and relevance to assisted reproductive technology in livestock: A review”. *Biology of Reproduction*, 103 (6), 1157-1170.
- d’Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L. A., Dixon, J. P., Day, K., Leitch, H. G., Hendrick, A. G., ... and Colledge, W. H. (2007). “Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10714-10719.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J-C., Matsuda, F., Chaussain, J-L. and Milgrom, E. (2003). “Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide

- receptor GPR54.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (19), 10972-10976.
- Drazen, D. L., Kriegsfeld, L. J., Schneider, J. E., and Nelson, R. J. (2000). “Leptin, but not immune function, is linked to reproductive responsiveness to photoperiod.” *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(6), R1401-R1407.
- Ebling, F. J. (1996). “The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus.” *Progress in Neurobiology*, 50 (2-3), 109-132.
- Elliott, J. A. (1976). “Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals.” *Federation Proceedings*, 35 (12), 2339-2346.
- Erlich, S. S. and Apuzzo, M. L. J. (1985). “The pineal gland: Anatomy, physiology and clinical significance.” *Journal of Neurosurgery*, 63 (3), 321-341.
- Flier, J.S., (1998). Clinical review 94: “What’s in a name? In search of leptin’s physiologic role.” *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 83, 1407–1413.
- Friedman, J. M., and Halaas, J. L. (1998). “Leptin and the regulation of body weight in mammals.” *Nature*, 395(6704), 763-770.
- Fukusumi, S., Habata, Y., Yoshida, H., Iijima, N., Kawamata, Y., Hosoya, M. ... Fujino, M. (2001). “Characteristics and distribution of endogenous RFamide-related peptide-1”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1540 (3), 221-232.
- Fukusumi, S., Yoshida, H., Fujii, R., Maruyama, M., Komatsu, H., Habata, Y. ... Fujino, M. (2003). “A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats.” *Journal of Biological Chemistry*, 278 (47), 46387-46395.
- Funes, S., Hedrick, J. A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., ... and Gustafson, E. L. (2003). “The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4), 1357-1363.
- Garcia-Galiano, D., Navarro, V. M., Roa, J., Ruiz-Pino, F., Sanchez-Garrido, M. A., Pineda, R. ... Tena-Sempere, M. (2010). “The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat.” *Journal of Neuroscience*, 30 (23), 7783-7792.
- Gaston, S. and Menaker, M. (1967). “Photoperiodic control of hamster testis.” *Science*, 158 (3803), 925-928.

- Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, J. M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., ... and Tena-Sempere, M. (2009). "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." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(3), E520-E531.
- Gibson, E. M., Humber, S. A., Jain, S., Williams, W. P. 3rd., Zhao, S., Bentley, G. E. ... Kriegsfeld, L. J. (2008). "Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge." *Endocrinology*, 149 (10), 4958-4969.
- Glass, J. D., Grossman, G. H., Farnbauch, L. and DiNardo, L. (2003). "Midbrain Raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the Mammalian Suprachiasmatic Nucleus." *Journal of Neuroscience*, 23 (20), 7451-7460.
- Gore, A. C. (2002). "Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: Gene expression and neuroanatomical studies." *Progress in Brain Research*, 141, 193-208.
- Gotlieb, N., Baker, C. N., Moeller, J., and Kriegsfeld, L. J. (2019). "Time-of-day-dependent sensitivity of the reproductive axis to RFamide-related peptide-3 inhibition in female Syrian hamsters." *Journal of Neuroendocrinology*, 31(11), e12798.
- Gottsch, M. L., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. (2009). "From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature." *Peptides*, 30 (1), 4-9.
- Grosbellet, E., Gourmelen, S., Pévet, P., Criscuolo, F., and Challet, E. (2015). "Leptin normalizes photic synchronization in male ob/ob mice, via indirect effects on the suprachiasmatic nucleus." *Endocrinology*, 156(3), 1080-1090.
- Gündüz, B., and Stetson, M. H. (1994). "Effects of photoperiod, pinealectomy, and melatonin implants on testicular development in juvenile Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*)." *Biology of Reproduction*, 51(6), 1181-1187.
- Gündüz, B. (2002). "Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(2), 393-401.
- Gündüz, B., and Stetson, M. H. (2003). "Reproductive response of adult Siberian hamsters to one-hour melatonin infusions." *Turkish Journal of Biology*, 27(2), 57-63.
- Gündüz, B., Karakaş, A., Terzi, H., Öner, J., Serin, E., and Kükner, A. (2009). "The effect of pinealectomy and leptin hormone on the proliferation and apoptosis activation in Syrian hamster testis in different photoperiods." *International Journal of Andrology*,

32(4), 343-352.

- Gündüz, B., and Karakaş, A. (2011). "The effects of leptin hormone on locomotor activity in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*).” *Turkish Journal of Biology*, 35(6), 727-734.
- Hahn, J. D. and Coen, C. W. (2006). "Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats.” *Journal of Comparative Neurology*, 494 (1), 190-214.
- Han, S. K., Gottsch, M. L., Lee, K. J., Popa, S. M., Smith, J. T., Jakawich, S. K. ... Herbison, A. E. (2005). "Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty”. *Journal of Neuroscience*, 25 (49), 11349-11356.
- Hannibal, J. and Fahrenkrug, J. (2004). "Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells”. *Cell and Tissue Research*, 316 (1), 99-113.
- Hannibal, J., Hindersson, P., Østergaard, J., Georg, B., Heegaard, S., Larsen, P. J. and Fahrenkrug, J. (2004). "Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45 (11), 4202-4209.
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., and Cardinali, D. P. (2006). "Melatonin.” *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38:313-6.
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M. and Pandi-Perumal, S. R. (2011). "Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule.” *Progress in Neurobiology*, 93 (3), 350-384.
- Hastings, M. H., Reddy, A. B. and Maywood, E. S. (2003). "A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease”. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (8), 649-661.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M. and Yau, K. W. (2002). "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity”. *Science*, 295 (5557), 1065-1070.
- Hattar, S., Lucas, R. J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R. H., Hankins, M. W. ... Yau, K. W. (2003). "Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice”. *Nature*, 424 (6944), 76-81.

- Hazlerigg, D. G. and Simonneaux, V. (2015). "Seasonal regulation of reproduction in mammals". T. M. Plant and A. J. Zeleznik (eds.). in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 1575-1604. Academic Press: Cambridge, Massachusetts, ABD.
- Herbison, A. E. (2016). "Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons." *Nature Reviews Endocrinology*, 12 (8), 452-466.
- Herbison, A. E. and Moenter, S. M. (2011). "Depolarising and hyperpolarising actions of GABA(A) receptor activation on gonadotrophin-releasing hormone neurones: Towards an emerging consensus." *Journal of Neuroendocrinology*, 23 (7), 557-569.
- Hinuma, S., Habata, Y., Fujii, R., Kawamata, Y., Hosoya, M., Fukusumi, S. ... Fujino, M. (1998). "A prolactin-releasing peptide in the brain." *Nature*, 393 (6682), 272-276.
- Hinuma, S., Shintani, Y., Fukusumi, S., Iijima, N., Matsumoto, Y., Hosoya, M. ... Fujino, M. (2000). "New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals." *Nature Cell Biology*, 2 (10), 703-708.
- Hoffman, R. A. and Reiter, R. J. (1965). "Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters." *Science*, 148 (3677), 1609-1611.
- Hoffman, R. A. and Reiter, R. J. (1965). "Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents." *The Anatomical Record*, 153 (1), 19-21.
- Hoffmann, K. (1982). "The critical photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*". in: *Vertebrate Circadian Systems: Structure and Physiology*, 297-304. Springer: Berlin Heidelberg.
- Horton, T. H., Buxton, O. M., Losee-Olson, S., and Turek, F. W. (2000). "Twenty-four-hour profiles of serum leptin in siberian and golden hamsters: photoperiodic and diurnal variations." *Hormones and Behavior*, 37(4), 388-398.
- Ikeno, T., Weil, Z. M., and Nelson, R. J. (2014). "Dim light at night disrupts the short-day response in Siberian hamsters." *General and Comparative Endocrinology*, 197, 56-64.
- Jan, J. E., Reiter, R. J., Wong, P. K. H., Bax, M. C. O., Ribary, U. and Wasdell, M. B. (2011). "Melatonin has membrane receptor-independent hypnotic action on neurons: An hypothesis". *Journal of Pineal Research*, 50 (3), 233-240.
- Jiang, Y., Luo, L., Gustafson, E. L., Yadav, D., Laverty, M., Murgolo, N. ... Zhang, F. L. (2003). "Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155". *Journal of Biological Chemistry*, 278 (30), 27652-27657.

- Johnson, M.A., Tsutsui, K. and Fraley, G.S. 2007. "Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat." *Hormones & Behaviour*, 51 (1): 171–180.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Roming, J.A., et al., (2001). "The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels." *Endocrinology*. 142, 2677–2685.
- Kalsbeek, A. and Buijs, R. M. (2002). "Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: Coding circadian time by transmitter selection and specific targeting." *Cell and Tissue Research*, 309 (1), 109-118.
- Kaprara, A. and Huhtaniemi, I. T. (2018). "The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men." *Metabolism*, 86, 3-17.
- Karakaş, A., Coşkun, H., & Kaya, A. (2011). "The effects of pinealectomy, melatonin injections and implants on the spatial memory performance of male Wistar rats." *Biological Rhythm Research*, 42(6), 457-472.
- Karakaş, A. ve Gündüz, B. (2002). "Effect of different photoperiods on gonadal maintenance and development in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)." *Zoological Science*, 19 (2), 233-239.
- Karakaş, A., and Gündüz, B. (2006). "Suprachiasmatic nuclei may regulate the rhythm of leptin hormone release in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)." *Chronobiology International*, 23(1-2), 225-236.
- Kelly, K. K., Dark, J., and Zucker, I. (1995). "Suprachiasmatic nucleus and photoperiodic regulation of gonadal development in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*." *Neuroscience Letters*, 190(2), 129-132.
- Kiess, W., Reich, A., Meyer, K., Glasow, A., Deutscher, J., Klammt, J., ... and Kratzsch, J. (1999). "A role for leptin in sexual maturation and puberty?" *Hormone Research*, 51(Suppl. 3), 55-63.
- Kiess, W., Müller, G., Galler, A., Reich, A., Deutscher, J., Klammt, J., and Kratzsch, J. (2000). "Body fat mass, leptin and puberty." *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13(Supplement), 717-722.
- Kittrell, E. M. W. (1991). "The suprachiasmatic nucleus and temperature rhythms." *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock*, 233-245.
- Knobil, E., Plant, T. M., Wildt, L., Belchetz, P. E. and Marshall, G. (1980). "Control of the rhesus monkey menstrual cycle: Permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone." *Science*, 207 (4437), 1371-1373.

- Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O., Inoue, K. ... Silver, R. (2006). "Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (7), 2410-2415.
- Kuş, I. and Sarsılmaz, M. (2002). "The morphological structure and functions of the pineal gland." *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22 (2), 221-226.
- Kuş, I., Sarsılmaz, M., Ozen, O. A., Turkoglu, A. O., Pekmez, H., Songur, A., and Kelestimur, H. (2004). "Light and electron microscopic examination of pineal gland in rats exposed to constant light and constant darkness." *Neuroendocrinology Letters*, 25(1-2), 102-108.
- Lee, D. K., Nguyen, T., O'Neill, G. P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A. D. ... O'Dowd, B. F. (1999). "Discovery of a receptor related to the galanin receptors." *FEBS Letters*, 446 (1), 103-107.
- Lee, J. H., Miele, M. E., Hicks, D. J., Phillips, K. K., Trent, J. M., Weissman, B. E. and Welch, D. R. (1996). "KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene." *Journal of the National Cancer Institute*, 88 (23), 1731-1737.
- Lehman, M. N., Merkley, C. M., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). "Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals." *Brain research*, 1364, 90-102.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., and Mori, W. (1958). "Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyte S1." *Journal of the American Chemical Society*, 80(10), 2587-2587.
- Liu, Q., Guan, X. M., Martin, W. J., McDonald, T. P., Clements, M. K., Jiang, Q. ... Austin, C. P. (2001). "Identification and characterization of novel mammalian neuropeptide FF-like peptides that attenuate morphine-induced antinociception." *Journal of Biological Chemistry*, 276 (40), 36961-36969.
- Liu, X., Lee, K., and Herbison, A. E. (2008). "Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels." *Endocrinology*, 149(9), 4605-4614.
- Loiseau, F., Bihan, C. L., Hamon, M., Thiebot, M. H. (2006). "Effects of melatonin and agomelatine in anxiety-related procedures in rats: Interaction with diazepam." *European Neuropsychopharmacology*. 16:417-28.

- Lowrey, P. L. and Takahashi, J. S. (2004). "Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization." *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, 407-441.
- Luque, R. M., Kineman, R. D. and Tena-Sempere, M. (2007). "Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Analyses using mouse models and a cell line." *Endocrinology*, 148 (10), 4601-4611.
- Masana, M. I., and Dubocovich, M. L. (2001). "Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark." *Science STKE*, 39.
- Mason, A. O., Greives, T. J., Scotti, M. A. L., Levine, J., Frommeyer, S., Ketterson, E. D. ... Kriegsfeld, L. J. (2007). "Suppression of kisspeptin expression and gonadotropic axis sensitivity following exposure to inhibitory day lengths in female Siberian hamsters." *Hormones and Behavior*, 52 (4), 492-498.
- Mason, A. O., Duffy, S., Zhao, S., Ubuka, T., Bentley, G. E., Tsutsui, K., ... and Kriegsfeld, L. J. (2010). "Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)." *Journal of Biological Rhythms*, 25(3), 176-185.
- Masson-Pévet, M., Bianchi, L. and Pevet, P. (1996). "Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: Comparison with light induction of fos-related protein." *Journal of Neuroscience Research*, 43 (5), 632-637.
- Meijer, J. H. and Schwartz, W. J. (2003). "In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus." *Journal of Biological Rhythms*, 18 (3), 235-249.
- Merchenthaler, I., Gorcs, T., Setalo, G., Petrusz, P. and Flerko, B. (1984). "Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain". *Cell and Tissue Research*, 237 (1), 15-29.
- Miernicki, M. J.D. Karp, and Powers, J. B. (1990). "Pinealectomy prevents short photoperiod inhibition of male hamster sexual behavior." *Physiology & Behavior*. 47:293-299.
- Mintz, E. M., Jasnow, A. M., Gillespie, C. F., Huhman, K. L. and Albers, H. E. (2002). "GABA interacts with photic signaling in the suprachiasmatic nucleus to regulate circadian phase shifts." *Neuroscience*, 109 (4), 773-778.
- Moga, M. M. and Moore, R. Y. (1997). "Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat." *Journal of Comparative Neurology*, 389 (3), 508-534.

- Moore, R. Y. and Eichler, V. B. (1972). "Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat." *Brain Research*, 42 (1), 201-206.
- Moore, R. Y., and Klein, D. C. (1974). "Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity." *Brain Research*, 71(1), 17-33.
- Moore, R. Y. and Speh, J. C. (1993). "GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system." *Neuroscience Letters*, 150 (1), 112-116.
- Moore, R. Y., Speh, J. C. and LeakTomi, R. K. (2002). "Suprachiasmatic nucleus organization." *Cell and Tissue Research*, 309 (1), 89-98.
- Moore, R. Y., Weis, R. and Moga, M. M. (2000). "Efferent projections of the intergeniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the rat". *Journal of Comparative Neurology*, 420 (3), 398-418.
- Mrosovsky, N., Lucas, R. J. and Foster, R. G. (2001). "Persistence of masking responses to light in mice lacking rods and cones". *Journal of Biological Rhythms*, 16 (6), 585-588.
- Nir, I. (2003). "Melatonin for the treatment of disorders in circadian rhythm and sleep: Could it form a basis for medication?". *Receptors and Channels*, 9 (6), 379-385.
- Nosjean, O., Nicolas, J. P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., and Boutin, J. A. (2001). "Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2." *Biochemical Pharmacology*, 61(11), 1369-1379.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K. ... Fujino, M. (2001). "Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G protein-coupled receptor." *Nature*, 411 (6837), 613-617.
- Oike, H., Oishi, K. and Kobori, M. (2014). "Nutrients, clock genes, and chrononutrition." *Current Nutrition Reports*, 3 (3), 204-212.
- Ojeda, S. R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A. S. ... Mungenast, A. E. (2006). "Minireview: The neuroendocrine regulation of puberty: Is the time ripe for a systems biology approach?" *Endocrinology*, 147 (3), 1166-1174.
- Ojeda, S. R., Lomniczi, A., Sandau, U. and Matagne, V. (2010). "New concepts on the control of the onset of puberty." *Endocrine Development*, 17, 44-51.
- Özata, M., Dieguez, C., & Casanueva, F. F. (2003). "The inhibition of growth hormone secretion presented in obesity is not mediated by the high leptin levels: a study in human

- leptin deficiency patients.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(1), 312-316.
- Panke, E. S., Rollag, M. D., and Reiter, R. J. (1979). “Pineal melatonin concentrations in the Syrian hamster.” *Endocrinology*, 104(1), 194-197.
- Panula, P., Kalso, E., Nieminen, M., Kontinen, V. K., Brandt, A. and Pertovaara, A. (1999). “Neuropeptide FF and modulation of pain”. *Brain Research*, 848 (1-2), 191-196.
- Perry, S. J., Yi-Kung Huang, E., Cronk, D., Bagust, J., Sharma, R., Walker, R. J. ... Burke, J. F. (1997). “A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPF and FMRFamide”. *FEBS Letters*, 409 (3), 426-430.
- Pickavance, L., Tadayyon, M., Williams, G., and Vernon, R.G., (1998). “Lactation suppresses diurnal rhythm of serum leptin.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 248, 196–199.
- Piekarski, D. J., Jarjisian, S. G., Perez, L., Ahmad, H., Dhawan, N., Zucker, I., and Kriegsfeld, L. J. (2014). “Effects of pinealectomy and short day lengths on reproduction and neuronal RFRP-3, kisspeptin, and GnRH in female Turkish hamsters.” *Journal of Biological Rhythms*, 29(3), 181-191.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P. and Tena-Sempere, M. (2012). “Kisspeptins and reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms.” *Physiological Reviews*, 92 (3), 1235-1316.
- Plant, T. M. (2015). “60 Years Of Neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary–gonadal axis.” *Journal of Endocrinology*, 226(2), T41-T54.
- Popa, S. M., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. (2008). “The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction.” *Annual Review of Physiology*, 70, 213-238.
- Pralong, F. P. (2010). “Insulin and NPY pathways and the control of GnRH function and puberty onset.” *Molecular and Cellular Endocrinology*, 324 (1-2), 82-86.
- Prendergast, B. J., Jean Gorman, M. R. and Zucker, I. (2000). “Establishment and persistence of photoperiodic memory in hamsters.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (10), 5586-5591.
- Price, D. A. and Greenberg, M. J. (1977a). “Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide.” *Science*, 197 (4304), 670-671.

- Price, D. A. and Greenberg, M. J. (1977b). "Purification and characterization of a cardioexcitatory neuropeptide from the central ganglia of a bivalve mollusc." *Preparative Biochemistry*, 7 (3-4), 261-281.
- Qi, Y., Oldfield, B. J. and Clarke, I. J. (2009). "Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction". *Journal of Neuroendocrinology*, 21 (8), 690-697.
- Rance, N. E. and Bruce, T. R. (1994). "Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats." *Neuroendocrinology*, 60 (4), 337-345.
- Refinetti, R., Kaufman, C. M. and Menaker, M. (1994). "Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters." *Journal of Comparative Physiology A*, 175 (2), 223-232.
- Reiter, R. J. (1980). "Photoperiod: Its importance as an impeller of pineal and seasonal reproductive rhythms." *International Journal of Biometeorology*, 24 (1), 57-63.
- Reiter, R. J. (1987). "The melatonin message: duration versus coincidence hypothesis." *Life Sciences*, 40, 2119-31.
- Reiter, R.J., (1993). "The melatonin rhythm: both a clock and a calendar." *Experientia* 49, 654–664.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., and Sainz, R. M. (2009). "Melatonin and reproduction revisited." *Biology of Reproduction*, 81(3), 445-456.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V. (2006). "KiSS-1: A likely candidate for the photoperiodic control of reproduction in seasonal breeders." *Chronobiology International*, 23 (1-2), 277-287.
- Revel, F. G., Saboureau, M., Pevet, P., Simonneaux, V., and Mikkelsen, J. D. (2008). "RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene." *Endocrinology*, 149(3), 902-912.
- Ronchi, E., Krey, L. C., and Pfaff, D. W. (1992). "Steady state analysis of hypothalamic GnRH mRNA levels in male Syrian hamsters: influences of photoperiod and androgen." *Neuroendocrinology*, 55(2), 146-155.
- Ross, M. H. and Pawlina, W. (2013). "Histology: A text and atlas." Litsa Medical Publications: Athens.

- Rovsing, L., and Møller, M. (2014). “Photic stimulation of the suprachiasmatic nucleus via the non-visual optic system. A gene expression study in the blind *Crx*^{-/-} mouse.” *Cell and Tissue Research*, 358, 239-248.
- Sari, I. P., Rao, A., Smith, J. T., Tilbrook, A. J., and Clarke, I. J. (2009). “Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes.” *Endocrinology*, 150 (12), 5549-5556.
- Satake, H., Hisada, M., Kawada, T., Minakata, H., Ukena, K. and Tsutsui, K. (2001). “Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release.” *Biochemical Journal*, 354 (2), 379-385.
- Schally, A. V., Arimura, A., Kastin, A. J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W. ... White W. F. (1971). “Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones.” *Science*, 173 (4001), 1036-1038.
- Shimokawa, I., and Higami, Y., (1999). “A role for leptin in the antiaging action of dietary restriction: A hypothesis.” *Aging Clinical and Experimental Research*. 11, 380–382.
- Shirakawa, T. and Moore, R. Y. (1994). “Glutamate shifts the phase of the circadian neuronal firing rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro.” *Neuroscience Letters*, 178 (1), 47-50.
- Simonneaux, V. and Ribelayga, C. (2003). “Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters.” *Pharmacological Reviews*, 55 (2), 325-395.
- Simonneaux, V., Bur, I., Ancel, C., Ansel, L. and Klosen, P. (2012). “A kiss for daily and seasonal reproduction.” *Progress in Brain Research*, 199, 423-437.
- Simonneaux, V., Ancel, C., Poirel, V. J., and Gauer, F. (2013). “Kisspeptins and RFRP-3 act in concert to synchronize rodent reproduction with seasons.” *Frontiers in Neuroscience*, 7, 22.
- Smith, J. T., Clay, C. M., Caraty, A., and Clarke, I. J. (2007). “KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season.” *Endocrinology*, 148(3), 1150-1157.
- Smith, J. T. and Clarke, I. J. (2010). “Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals.” *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21, 255-260.

- Smith, J. T., Acohido, B. V., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. (2006). "Kiss-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse." *Journal of Neuroendocrinology*, 18 (4), 298-303.
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. (2005) "Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse." *Endocrinology*, 146 (9), 3686-3692.
- Snodgrass-Belt, P., Gilbert, J. L. and Davis, F. C. (2005). "Central administration of transforming growth factor-alpha and neuregulin-1 suppress active behaviors and cause weight loss in hamsters." *Brain Research*, 1038 (2), 171-182.
- Steinlechner, S. (1996). "Melatonin as a chronobiotic: PROS and CONS." *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56(1), 363-372.
- Stetson, M. H. and Watson-Whitmyre, M. (1976). "Nucleus suprachiasmaticus: The biological clock in the hamster?" *Science*, 191 (4223), 197-199.
- Stopa, E. G., Volicer, L., Kuo-Leblanc, V., Harper, D., Lathi, D., Tate, B. and Satlin, A. (1999). "Pathologic evaluation of the human suprachiasmatic nucleus in severe dementia." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58 (1), 29-39.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. A., Acuna-Castroviejo, D. and Reiter, R. J. (2013). "Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes." *Journal of Pineal Research*, 54 (2), 127-138.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., ... and Tepper, R. I. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell*, 83(7), 1263-1271.
- Tartaglia, L. A. (1997). "The leptin receptor." *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6093-6096.
- Tominaga, K., Shinohara, K., Otori, Y., Fukuhara, C. and Inouye, S. T. (1992). "Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat." *Neuroreport*, 3 (9), 809-812.
- Trevisan, C. M., Montagna, E., De Oliveira, R., Christofolini, D. M., Barbosa, C. P., Crandall, K. A. and Bianco, B. (2018). "Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction?." *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49 (4), 1259-1276.
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M. ... Sharp, P. J.

- (2000). "A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275 (2), 661-667.
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Yin, H., Ubuka, T., Chowdhury, V. S., Osugi, T. ... Bentley, G. E. (2009). "A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotrophin-inhibitory hormone in birds: Discovery, progress and prospects." *Journal of Neuroendocrinology*, 21 (4), 271-275.
- Turek, F. W., Elliott, J. A., Alvis, J. D. and Menaker, M. (1975). "Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters." *Biology of Reproduction*, 13 (4), 475-481.
- Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L. J. and Tsutsui, K. (2012). "Identification, expression, and physiological functions of siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone." *Endocrinology*, 153 (1), 373-385.
- Uenoyama, Y., Pheng, V., Tsukamura, H., and Maeda, K. I. (2016). "The roles of kisspeptin revisited: inside and outside the hypothalamus." *Journal of Reproduction and Development*, 62(6), 537-545.
- Uenoyama, Y., Inoue, N., Maeda, K. I. and Tsukamura, H. (2018). "The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals." *Journal of Reproduction and Development*, 64 (6), 469-476.
- Ukena, K., and Tsutsui, K. (2001). "Distribution of novel RFamide-related peptide-like immunoreactivity in the mouse central nervous system." *Neuroscience Letters*, 300(3), 153-156.
- Ukena, K., Iwakoshi, E., Minakata, H. and Tsutsui, K. (2002). "A novel rat hypothalamic RFamide-related peptide identified by immunoaffinity chromatography and mass spectrometry." *FEBS Letters*, 512 (1-3), 255-258.
- Vanecek, J. (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." *Physiological Reviews*, 78 (3), 687-721.
- Villela, D., de Sá Lima, L., Peres, R., Peliciari-Garcia, R. A., do Amaral, F. G., Cipollaneto, J. ... Afeche, S. C. (2014). "Norepinephrine activates NF- κ B transcription factor in cultured rat pineal gland." *Life Sciences*, 94 (2), 122-129.
- Whitten, R. D., Youngstrom, T. G., and Bartness, T. J. (1993). "Hyperprolactinemia does not promote testicular recrudescence in photoregressed Siberian hamsters." *Physiology & Behavior*, 54(1), 175-178.

- Williams, L. M., Hannah, L. T., Hastings, M. H., and Maywood, E. S. (1995). "Melatonin receptors in the rat brain and pituitary." *Journal of Pineal Research*, 19(4), 173-177.
- Wirz-Justice, A. (2001). "Treatment tools in chronobiology." *Revue de Médecine Interne*. 22 (suppl. 1):37-8.
- Witkin, J. W., Paden, C. M. and Silverman, A. J. (1982). "The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain." *Neuroendocrinology*, 35 (6), 429-38.
- Wolthers, O.D., Heuck, C., Skjaerbaek, C., (1999). "Diurnal rhythm in serum leptin." *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 12, 863–866.
- Wray, S. and Hoffman, G. (1986). "A developmental study of the quantitative distribution of LHRH neurons within the central nervous system of postnatal male and female rats." *Journal of Comparative Neurology*, 252 (4), 522-531.
- Wu, Y. H. and Swaab, D. F. (2005). "The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease." *Journal of Pineal Research*, 38 (3), 145-152.
- Yang, H. Y., Fratta, W., Majane, E. A. and Costa, E. (1985). "Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82 (22), 7757-7761.
- Yazıcı, C. ve Köse, K. (2004). "Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü." *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13 (2), 56-65.
- Yellon, S. M. (1994). "Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster." *Journal of Pineal Research*, 16(3), 136-144.
- Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D. ... Takahashi J. S. (2004). "Period2: Luciferase real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (15), 5339-5346.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature*, 372 (6505), 425-432.
- Zhou, Q. Y. and Cheng, M. Y. (2005). "Prokineticin 2 and circadian clock output." *The FEBS Journal*, 272 (20), 5703-5709.