

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**SIÇANLARDA PROLAKTİN İLE İNFERTİLİTE  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN, HİPOTALAMUS  
HÜCRELERİNDEKİ KISS1, KISS1 RESEPTÖR,  
NÖROKİNİN, NÖROKİNİN RESEPTÖR GENLERİ  
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN REAL TIME PCR  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**Eylül AKBAL IŞIK**

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ**

**ADANA-2017**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**SIÇANLARDA PROLAKTİN İLE İNFERTİLİTE  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN, HİPOTALAMUS  
HÜCRELERİNDEKİ KISS1, KISS1 RESEPTÖR,  
NÖROKİNİN, NÖROKİNİN RESEPTÖR GENLERİ  
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN REAL TIME PCR  
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

**Eylül AKBAL IŞIK**

**TIBBİ BİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI  
Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2014YL3 proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....  
**ADANA-2017**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım bu yolda bilgi ve tecrübeleriyle yol göstericilerim olan Prof. Dr. Halil KASAP ve Prof. Dr. Mülkiye KASAP hocalarıma, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde yardım ve desteklerini esirgemeyen yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız değerli Öğretim Üyelerinden, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP'a, Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN'a ve Prof. Dr. Ayfer PAZARBAŞI'na tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Son olarak, sevgilerini hiç bir zaman esirgemeyen, her konuda arkamda duran, destekleri ile beni cesaretlendiren EŞİME ve AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                                      | iii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                   | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                               | v    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                             | vi   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                | vii  |
| ÖZET .....                                                          | viii |
| ABSTRACT .....                                                      | ix   |
| 1. GİRİŞ .....                                                      | 1    |
| 2. GENEL BİLGİ .....                                                | 3    |
| 2.1. Kadınlarda Üreme Fizyolojisi .....                             | 3    |
| 2.2. Dişi Sıçanlarda Üreme Fizyolojisi .....                        | 6    |
| 2.3. İnfertilite .....                                              | 8    |
| 2.4. Prolaktin, Hiperprolaktinemi ve İnfertilite ile İlişkisi ..... | 9    |
| 2.5. Kisspeptin .....                                               | 13   |
| 2.6. Nörokinin .....                                                | 15   |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM .....                                            | 19   |
| 3.1. Gruplandırma ve Deneysel Uygulama .....                        | 19   |
| 3.2. Hayvansal dokuların elde edilmesi .....                        | 20   |
| 3.3. RNA İzolasyonu .....                                           | 23   |
| 3.4. cDNA Eldesi .....                                              | 23   |
| 3.5. Real Time RT- PCR .....                                        | 24   |
| 3.6. Real Time RT- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....         | 26   |
| 3.7. İstatistiksel Analiz .....                                     | 26   |
| 4. BULGULAR .....                                                   | 28   |
| 5. TARTIŞMA .....                                                   | 35   |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....                                          | 39   |
| KAYNAKLAR .....                                                     | 40   |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                      | 48   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Şekil No:

### Sayfa No:

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Hipofiz hipotalamus dolaşım sistemi.....                                                      | 3  |
| Şekil 2. Menstrüal siklusun hormonal kontrolü .....                                                    | 4  |
| Şekil 3. Normal menstrüel siklus sırasında hormon seviyeleri .....                                     | 5  |
| Şekil 4. Dişi sıçanlarda ürogenital sistem anatomisi.....                                              | 6  |
| Şekil 5. Dişi sıçanlarda östrus siklusu.....                                                           | 8  |
| Şekil 6. Prolaktin salınımının kontrolü .....                                                          | 12 |
| Şekil 7. Kisspeptin geni ve ürünleri: kisspeptin-54, kisspeptin-14, kisspeptin-13, kisspeptin-10. .... | 13 |
| Şekil 8. NK geni ve reseptörleri.....                                                                  | 16 |
| Şekil 9. Taşikinin reseptörleri .....                                                                  | 17 |
| Şekil 10. Nörokinin, Kisspeptin ve gonadotropin ilişkisi .....                                         | 18 |
| Şekil 11. Sıçandan ventriküler kanın alınması.....                                                     | 21 |
| Şekil 12. Bregma atlasına göre hipotalamik alan.....                                                   | 22 |
| Şekil 13. Sıçan beyni .....                                                                            | 22 |
| Şekil 14. Prolaktin düzeyleri.....                                                                     | 29 |
| Şekil 15. Kiss düzeyleri .....                                                                         | 30 |
| Şekil 16. KissR düzeyleri .....                                                                        | 31 |
| Şekil 17. NK düzeyleri .....                                                                           | 33 |
| Şekil 18. NKR düzeyleri.....                                                                           | 34 |

# ÇİZELGELER DİZİNİ

## Çizelge No:

## Sayfa No:

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.</b> Deney hayvanlarının gruplandırılma biçimleri .....                                   | 19 |
| <b>Çizelge 2.</b> 2xRT master mix bileşenleri ve miktarları. ....                                      | 24 |
| <b>Çizelge 3.</b> cDNA eldesi için Thermal Cycler’da kullanılan program .....                          | 24 |
| <b>Çizelge 4.</b> Real Time RT- PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları .....                      | 25 |
| <b>Çizelge 5.</b> Applied Biosystems 7500 real -time RT-PCR için kullanılan Program .....              | 26 |
| <b>Çizelge 6.</b> Gruplarda prolaktin düzeylerinin dağılımı.....                                       | 28 |
| <b>Çizelge 7.</b> SF ve Metaklopramid gruplarında Kiss düzeyleri .....                                 | 29 |
| <b>Çizelge 8.</b> SF veMetaklopramid gruplarında KissR düzeyleri.....                                  | 31 |
| <b>Çizelge 9.</b> SF ve Metaklopramid gruplarında NK düzeyleri.....                                    | 32 |
| <b>Çizelge 10.</b> SF ve Metaklopramid gruplarında NKR düzeyleri .....                                 | 33 |
| <b>Çizelge 11.</b> Metaklopramid uygulaması bittikten sonra deneklerin ilk yavruyu verme süreleri..... | 34 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|                                    |                                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>ARC</b>                         | : Arkuat nükleus                                  |
| <b>FSH</b>                         | : Folikül sitümüle edici hormon                   |
| <b>GnRH</b>                        | : Gonadotropin serbestleştirici hormon            |
| <b>GPR54</b>                       | : G protein kenetli reseptör 54                   |
| <b>KISS1</b>                       | : Kisspeptin                                      |
| <b>KISSR</b>                       | : Kisspeptin reseptörü                            |
| <b>HPG</b>                         | : Hipotalamus pitiüter aks                        |
| <b>LH</b>                          | : Lüteinize edici hormon                          |
| <b>LHRH</b>                        | : LH salıverici hormon                            |
| <b>NKA</b>                         | : Nörokinin A                                     |
| <b>NKB</b>                         | : Nörokinin B                                     |
| <b>NKBR</b>                        | : Nörokinin B reseptörü                           |
| <b>PCR</b>                         | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                     |
| <b>PRL</b>                         | : Prolaktin                                       |
| <b>PRF</b>                         | : Prolaktin salgılatıcı hormon                    |
| <b>RFPP</b>                        | : RF amid ilişkili protein                        |
| <b>RT-PCR</b>                      | : Real Time PCR                                   |
| <b>SP</b>                          | : Substans P                                      |
| <b>SSS</b>                         | : Santral sinir sistemi                           |
| <b>TAC2</b>                        | : Taşikinin 2                                     |
| <b>TAC3</b>                        | : Taşikinin 3                                     |
| <b>TACR2</b>                       | : Taşikinin 2 reseptörü                           |
| <b>TACR3</b>                       | : Taşikinin 3 reseptörü                           |
| <b>TRH</b>                         | : Tiroit düzenleyici hormon                       |
| <b>WHO</b>                         | : Dünya Sağlık Örgütü                             |
| <b><math>\Delta</math>Cp</b>       | : Cp Hedef Gen-Cp Referans Gen                    |
| <b><math>\Delta\Delta</math>Cp</b> | : $\Delta$ Cp Muamele Edilen- $\Delta$ Cp Kontrol |
| <b><math>\mu</math>l</b>           | : Mikrolitre                                      |

## ÖZET

### **Sıçanlarda Prolaktin ile İnfertilite Arasındaki İlişkinin, Hipotalamus Hücrelerindeki Kiss1, Kiss1 Reseptör, Nörokinin, Nörokinin Reseptör Genleri Ekspresyon Düzeylerinin Real Time PCR Yöntemi ile İncelenmesi**

Hipofizden salınan ve süt üretiminde rol alan prolaktin hormonu (PRL) polipeptit yapıda bir hormondur. Prolaktinmetabolizma ve üremegibi fizyolojik olaylarda rol almaktadır.Prolaktinin kan değerinin yükselmesiçeşitli bozukluklara yol açmaktadır. Bunlardan en önemlileri amenore/galaktore ve ovulasyonun bozulmasıdır. Ovulasyonun bozulması ciddi bir problemdir ve infertilite sorununa yol açabilmektedir. Ovulasyon hormon ve nöropeptid adı verilen biyolojik maddeler ile kontrol edilmektedir. Ovulasyonun kontrolünde görev aldığı düşünülen nöropeptidler arasında Kisspeptin ve Nörokininler de yer almaktadır.

Kisspeptin'ler hipotalamusun nöronal popülasyonlarında ayrı olarak eksprese edilen KISS1 geninde şifrelenmiş bir nöropeptit ailesidir.Pubertenin zamanlanması ve fertilitede anahtar rol oynamaktadırlar. Bu olaylarda etkili olduğu düşünülen diğer bir nöropeptid de Nörokinin B (NKB)' dir. Yapılan nöroanatomik çalışmalarda NKB'nin özellikle hipotalamik nöronlarda sentezlendiği gösterilmiştir. NKB'nin KISS1 ile benzer anatomik yerleşime sahip olması dolaylı olarak KISS1 sentezinde etkili olabileceği görüşünü öne sürmektedir. NKB ve KISS1' in puberte ve üremede etkili olan hormonlar ile etkileşim içinde olabilecekleri düşünülmektedir.

Prolaktin yüksekliği ile infertilite arasındaki ilişkinin Kisspeptin ve NKB ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu düşünmekteyiz. Bu yüzden çalışmamızda, ilgili genlerin insan ile sıçan arasında yüksek homoloji göstermesi nedeniyle, sıçanların kan prolaktin değerlerini yükselterek; Kiss1, Kiss1 Reseptör, Nörokinin, Nörokinin Reseptör genlerinin ekspresyon düzeyleri ile infertilite arasındaki ilişkiyi inceledik.

Elde ettiğimiz verilerde prolaktini yüksek deneklerimizde Kiss1, Kiss1 Reseptör ve Nörokinin genlerine ait ekspresyon değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görüldü ( $p<0,001$ ).

Sonuç olarak; sıçan hayvan modeli ile yaptığımız çalışmada, prolaktin yüksekliğinin üreme üzerine olan olumsuz etkilerine nöropeptitlerin aracılık edebileceği ve çalışmamızın prolaktin yüksekliğinin yol açtığı infertilite problemlerinin çözümüne bir ışık tutacağına inanmaktayız.

**Anahtar Kelimeler:** İnfertilite, Kisspeptin, Nörokinin, Prolaktin, Üreme.

## **ABSTRACT**

### **Study of The Relationship Between Prolactin and Infertility by Measuring the expression Levels of Kiss1, Kiss 1 Receptor, Neurokinin, Neurokinin Receptor Genes in Rat Hypothalamus Cells Through Real Time PCR**

Prolactin hormone, which is secreted from the hypophysis and plays role in production of milk, has a polypeptide structure. Prolactin plays role in physiological situation such as metabolism and reproductivity. Increase in prolactin blood level leads to various disorders. The most important disorders of these are amenore/galactore and anovulation. Anovulation is a critical problem and gives rise to infertility. The ovulation can be controlled by hormones and biological substances called neuropeptide. It has been considered that kisspeptin and neurokinins among neuropeptides are involved in control of the ovulation.

Kisspeptins, coded by Kiss1 gene separately expressed in neuronal populations of hypothalamus, are neuropeptide families. They play in roles timing of puberty and fertility. Furthermore, the other neuropeptide which has been thought effective in these situations is Neurokinin B (NKB). In recent neuroanatomic studies, it has been shown that NKB is synthesized in particularly hypothalamic neurons and arcuate nucleus which responses to sexual steroids. So it has been put forward that NKB affect indirectly KISS1 synthesis due to presence of NKB in this region. It has been thought that NKB and KISS1 interact with hormones involved in puberty and reproductivity.

We think that association between height of prolactin and infertility are relation of expression of kisspeptin and NKB. Therefore, in our study we investigated association between Kiss1, Kiss1 receptor, neurokinin and neurokinin receptor and infertility by increasing in blood prolactin level in rats due to high homology between human and rat.

It has been shown that in rats which have high prolactin level, expression values of Kiss1, Kiss1 Receptor and neurokinin genes decreased according to control group in our data ( $p < 0,001$ ).

As a result, we believe that neuropeptides mediate adverse effect of height of prolactin on reproductivity and our study shed light of solution of infertility problems caused by height of prolactin.

**KeyWords:** Infertility, Kisspeptin, Neurokinin, Prolactin, Reproductivity.

# 1. GİRİŞ

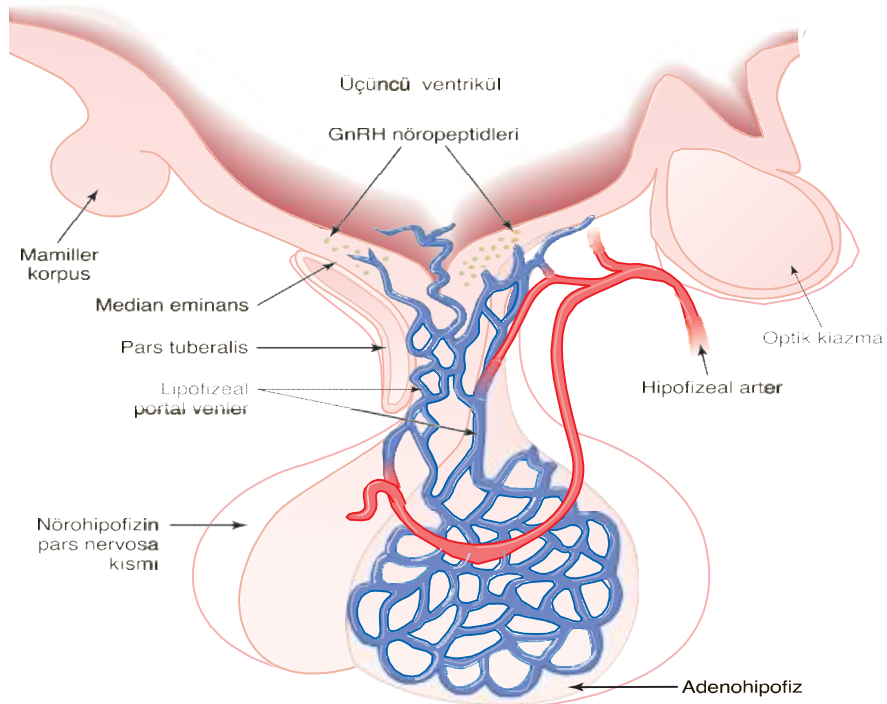
İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü(WHO) tarafından ciddi bir evrensel problem olarak tanımlanmıştır. Her yedi çiftten biri infertilite ya da subfertilite şikayetlerine sahiptir (1). İnfertiliteye neden olan kusurlardan biri de reproduktif sistemin düzenlenmesinde rol alan hormonların salınımında oluşan kusurlardır. Hiperprolaktinemi de bu kusurlar arasında bulunmaktadır. Hiperprolaktinemi her iki cinsiyette görülmesine rağmen kadınlarda daha sık rastlanmaktadır. Prevelansı yetişkin popülasyonda %0.4 iken, reproduktif bozukluğu olan kadınlarda %9-17 gibi yüksek düzeyde olabilmektedir (2). Bu değerler prolaktinin infertilite üzerine olan etkisini göstermektedir. Prolaktin hipotalamusun inhibe edici etkisi altında çalışan tek hormondur (3). Prolaktin seviyesinin yükselmesine paralel olarak hipogonadizimin ortaya çıktığı ve yüksek prolaktin düzeylerinin normal seviyeye çekilmesiyle birlikte hipogonadizimin gerilediği ispat edilmiştir (3). Hiperprolaktinemi durumunda gonadal disfonksiyon olduğu bilinmektedir ve anovulatuvar siklusta Lütinize Edici Hormon (LH) piki oluşamamakta veya progesteron fazı engellendiği için ovulasyon engellenmektedir. Kisspeptinlerin, Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH) bağımlı LH ve Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) salınımına neden oldukları G protein kenetli reseptör 54 (GPR54) mutasyonlu fare ve sıçanlarda gösterilmiştir ve periferik yolla verilen metastinin (Kisspeptin) hem dişi hem erkek sıçanlarda gonadotropin düzeylerini arttırdığı, prepubertal dişilerde ovulasyona neden olduğu bildirilmiştir (4,5). Kisspeptinler, RF amid ilişkili proteinler ailesinin (RFPP) üyeleridir ve GnRH nöroendokrin sisteminin önemli düzenleyicileridir (6). 1 nolu kromozomun q32 bölgesinde yer alan ve Kiss1 olarak adlandırılan gen tarafından transkribe edilen ve 145 amino asitlik öncül bir proteinden türeyerek GPR54 reseptörleri üzerine etki eden nöropeptidlerdir (7,8). GnRH salınımının geribeslemeli kontrolünde primer mediatör olarak Kisspeptin nöronları rol alır (9-11). Kisspeptinlerin temel üreme fonksiyonlarını etkilediğini destekleyen kanıtlar Kiss1 veya Gpr54 gen fonksiyonu inaktive edilmiş farelerde ve bu genlerin fonksiyonunu yitirmiş insanlarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir, dolayısıyla bu tip çalışmalar kisspeptinlerin memelilerin Hipotalamik-Pitiüter-Gonad (HPG) ekseninin kontrolündeki rolünün daha da kuvvetli bir şekilde ortaya konmasını sağlamıştır (12,13). Hipotalamusta GnRH salınımı ile ilişkili olduğu

belirlenen bir diğ er protein ise Neurokinin B' dir. Bu sinyal peptidi taşikinin ailesinin bir  yesi olup omurgalı ve omurgasızlarda hücre içi sinyalizasyonda görev alır. İnsanda en iyi bilinen taşikininler substance P (SP), nörokinin A (NKA) ve nörokinin B'dir (NKB) ve bunların hepsi yaygın olarak merkezi sinir sisteminde sentezlenirler. Substans P ve NKA'nın genelde nosisepsiyonda fonksiyonel olduğu düşünülürken insan üreme ekseninde rol oynadığı belirlenen NKB ve reseptörü NK3R'yi kodlayan sırasıyla Taşikinin 3ve Taşikinin 3 reseptörü (TAC3 ve TACR3) genleri insan ve kemirgenlerin (fare homologu TAC2 ve TACR2) merkezi sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edildiği gibi böbrek, iskelet kası, akciğer ve diğ er dokularda da sentezlenebilmektedir. Arkuat nükleusda NKB ve KISS1 ekspresyonunun aynı hücrelerde rastlanması bunların yakın ilişki içinde olabileceklerini göstermektedir. Nitekim fareler üzerinde yapılan çalışmalarda NKB agonistinin KISS1 ekspresyonunu arttırdığı ve dolayısıyla GnRH ve akabinde LH salınımını etkilediği gösterilmiştir (9,14). Kisspeptin ve NKB kendi aralarında ilişkili olabileceği gibi canlı sisteminde özellikle hipotalamusta GnRH salınımı üzerine etkisi olan diğ er hormonlarla da ilişkili olabilecekleri belirtilmiştir ki bunlardan biri de Prolaktin hormonudur. Hiperprolaktinemi GnRH salınımı üzerine olan inhibisyon nedeniyle ovulasyonu engelleyerek fertilizasyonu önlemektedir. Hiperprolaktinemili sıçanlara yapılan kisspeptin uygulaması ile prolaktinin GnRH  zerine olan inhibisyon etkisinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır ve kisspeptinin GnRH  zerine olan pozitif etkisi ile anovulasyon geri d nd r lm ştir (15). Tüm bu literatür bilgileri ışığı altında biz bu çalışmamızda yukarıda anlatılan prolaktin, GnRH, Kisspeptin ve Nörokininler arasındaki ilişkiyi ilgili reseptörleri ve genlerine ait ekspresyon düzeylerini inceleyerek açıklamaya çalışacağız. Böylelikle hala tam olarak aydınlatılamamış olan fertilizasyon genetiği için literatür kaynağı oluşturulacak hem de hala ciddi bir sağlık problemi olan infertilite tedavisinde yeni yöntemler geliştirilmesi için önemli bir adım olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİ

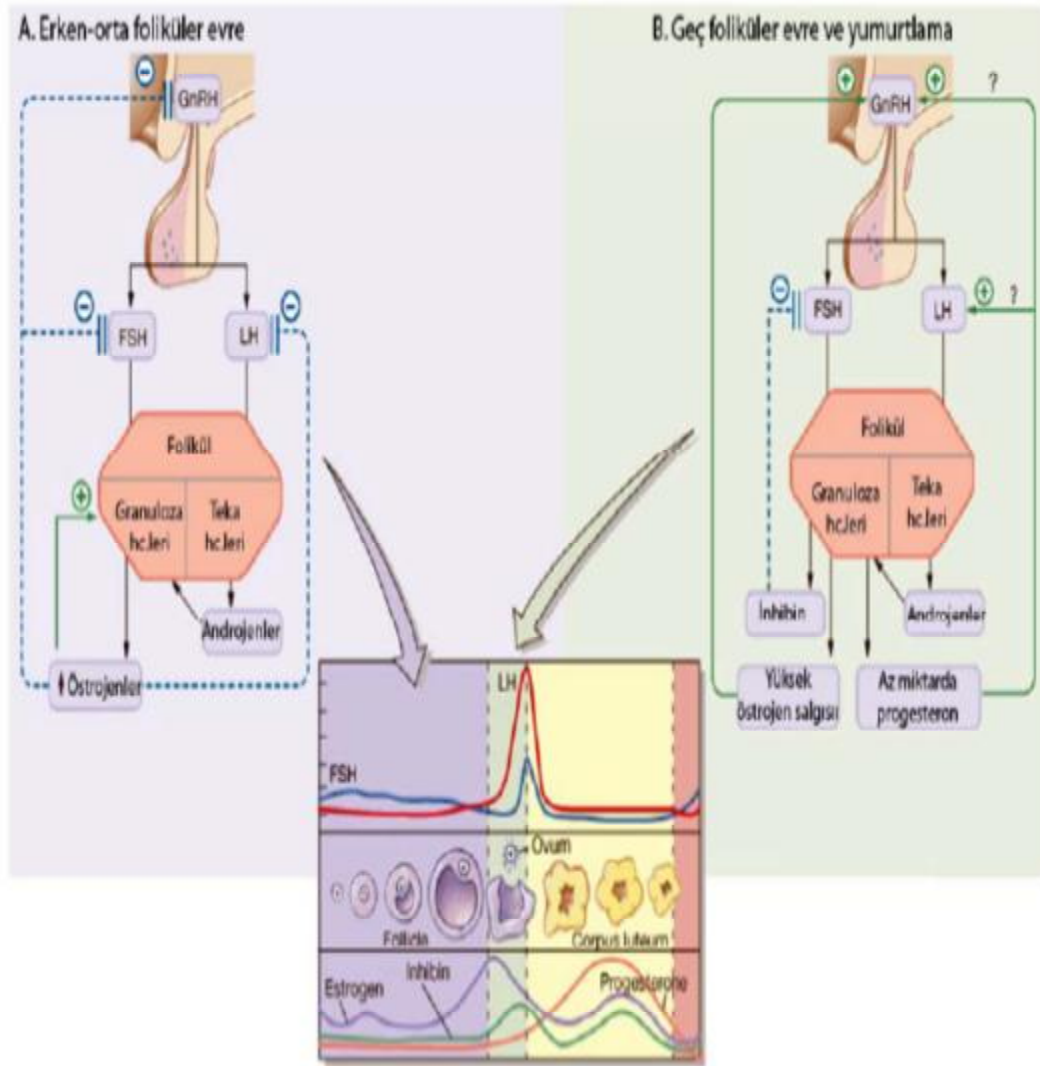
### 2.1. Kadınlarda Üreme Fizyolojisi

Kadınlarda üreme siklik bir döngü ile aylık periyotlar şeklinde ovulasyonla sağlanır. Buperyotlar menstüral siklus olarak tanımlanır. Menstüral siklus HPG aksı etkileşimi ile endometriyum değişikliklerinin görüldüğü kompleks bir olaydır (17,18). Bu kompleks döngünün kontrolünde görev alan HPG aksının en önemli parçalarından biri olan hipofiz bezi adeno ve nörohipofiz olmak üzere ikiye ayrılır. LH, FSH ve prolaktin gibi üreme fizyolojisinde rol alan hormonlar, hipofiz bezinin adenohipofiz olarak tanımlanan ön bölümünden salgınır. LH ve FSH adenohipofizin gonadotrop hücrelerinden salgınırken, prolaktin laktotrop hücrelerinden salgınır. Hipotalamus hipofiz tarafından salgınan bu hormonların kontrolünün yapıldığı bölgedir. LH ve FSH salgınımı hipotalamus tarafından salgınan GnRH tarafından kontrol edilir. GnRH, esas olarak arkuat nükleusta üretilir. GnRH kan dolaşımı ile önhipofize ulaşarak gonadotrop hücrelerinde depolanmış FSH ve LH' ın salgınımını uyarır (şekil 1). Böylece dolaşımdaki FSH ve LH miktarı artmış olur (17).



Şekil 1. Hipofiz hipotalamus dolaşım sistemi (17)

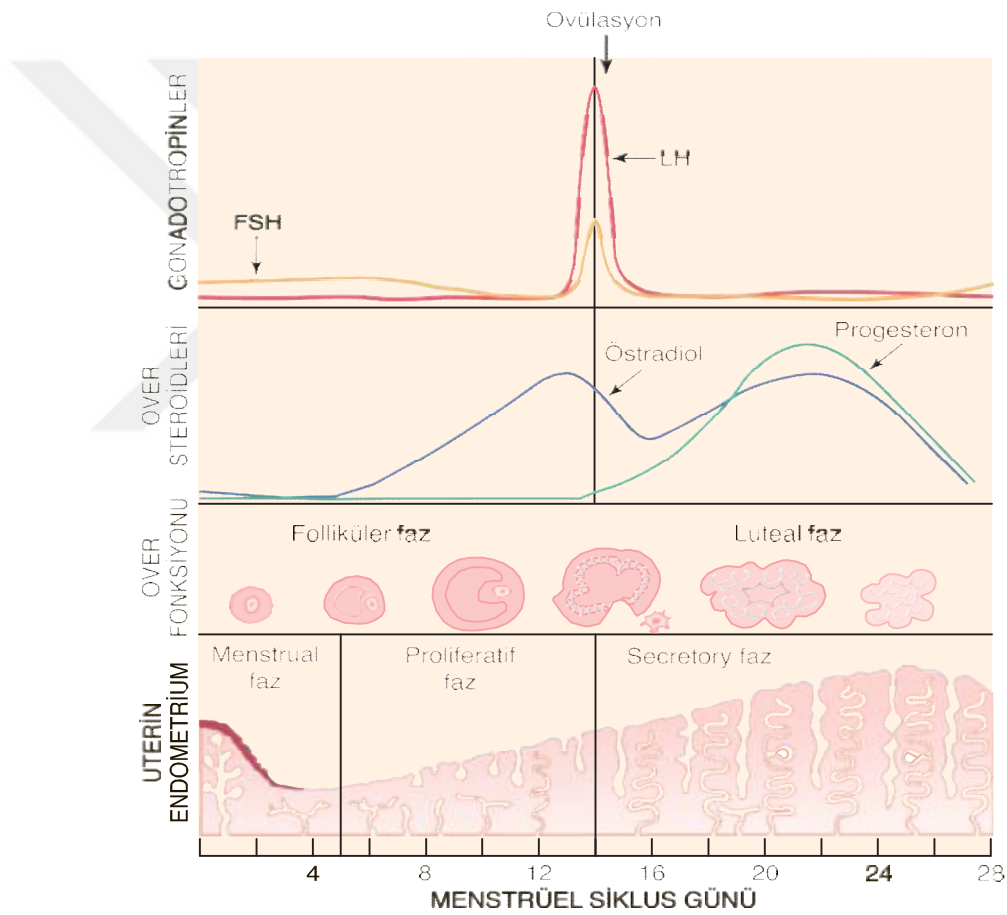
HPG aksı ile kan değerleri düzenlenen hormonlar ovulatuvar döngünün oluşmasını sağlar. Normal bir ovulatuvar döngü foliküler ve luteal faz olmak üzere 2' ye ayrılır (şekil 2). Foliküler faz menstrüasyonun başlamasıyla başlar ve LH'nın ovulasyon öncesi artmasıyla sona erer. Luteal faz ise ovulasyon öncesi LH yükselmesi ile başlayıp menstrüasyonun 1.günü sona erer (17).



Şekil 2. Menstrüel siklusun hormonal kontrolü (18)

Primer oosit doğumda tek katlı granuloza hücreleri ile çevrilidir ve bu yapı primordiyal folikül olarak adlandırılır. Puberte ile birlikte granuloza hücre tabakası

kalınlaşır, hücreler; östrojen, progesteron, inhibin, oosit-maturasyonu inhibe edici faktör, besin, kimyasal haberciler salgılar. Büyüyen bu folikül veziküler folikül adını alır ve overin dışına doğru çıkıntı oluşturur. Vezikülde bulunan östrojen lokal olarak hem kendi hem de FSH reseptör duyarlılığını artırır. FSH ve östrojen granuloza hücrelerini LH' ya duyarlı hale getirir. Folikül sıvısında bulunan östrojen önce negatif geri bildirim ile GnRH, FSH ve LH' yı baskılar. Dominant folikülde aşırı artan östrojen ve progesteronun etkisi ile HPG üzerine pozitif geri bildirim ile LH ve FSH ovulasyon öncesi pik yapar (şekil 3)(18).



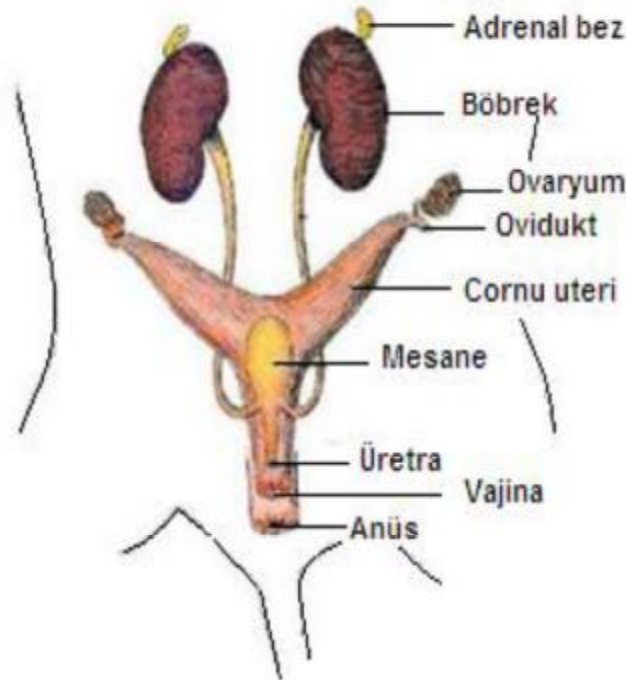
Şekil 3. Normal menstrüel siklus sırasında hormon seviyeleri (17)

Ovulasyondan sonra LH etkisi ile granuloza hücreleri luteinizasyona uğrar. Bu hücreler çevrelerinde bulunan teka hücreleri, kılcal damarlar ile korpus luteum denen yapıyı oluştururlar (19). Korpus luteum çok miktarda progesteron ve bir miktar estradiol

üretir.Yaklaşık 9-10 gün ömrü olan korpus luteum fertilizasyon olmadığı takdirde gerilemeye başlar.Bir önceki döngünün korpus luteumundan dolayı estradiol ve progesteron seviyeleri azalır ve negatif bir geri besleme mekanizması ile FSH artar.FSH foliküler büyümeyi ve estradiol sekresyonunu uyarır.Estradiol seviyeleri foliküler fazın sonlarına doğru yükselir ve depolanmış LH salınımını uyarır.LH ovulasyonu sağlar.Luteal fazda östradiol ve progesteronun artması LH ve FSH'ı baskılar. Bu baskı korpus luteumun gerilemesine kadar devam eder. Döllenmenin gerçekleşmesi halinde gebelik süreci başlarken, döllenmenin olmaması korpus luteumun gerilemesiyle sonuçlanır (17,19).

## 2.2. Dişi Sıçanlarda Üreme Fizyolojisi

Poliöstrik hayvanlar olan sıçanlar pubertenin başlamasıyla birlikte yıl boyu süren siklik aktivite gösterirler. Sıçanlarda üreme mevsimsel faktörlerden bağımsızdır (20). Sıçanlarda da insanlarda olduğu gibi siklik bir döngü görülmekte ve döllenme yılın her tarihinde gerçekleşebilmektedir.Sıçanlarda uterus bikornal yapıya sahiptir. Ovaryumlar iki adet ve foliküler tarzda olup yumurta kanalı aracılığı ile uterusun korn kısımlarına bağlanır (şekil 4) (21).



Şekil 4.Dişi sıçanlarda ürogenital sistem anatomisi (22)

Yavru sıçanlarda doğumdan hemen sonra hipotalamik Lüteinize edici hormon salıverici hormon (LHRH) salınımı ve GnRH ekspresyonu artmaktadır (23). Plazma FSH seviyeleri ise doğumu takip eden birkaç gün içinde artmaya başlamaktadır. LHRH salınımındaki sıklığın artması plazma FSH seviyesinde azalmaya yol açmaktadır (24).

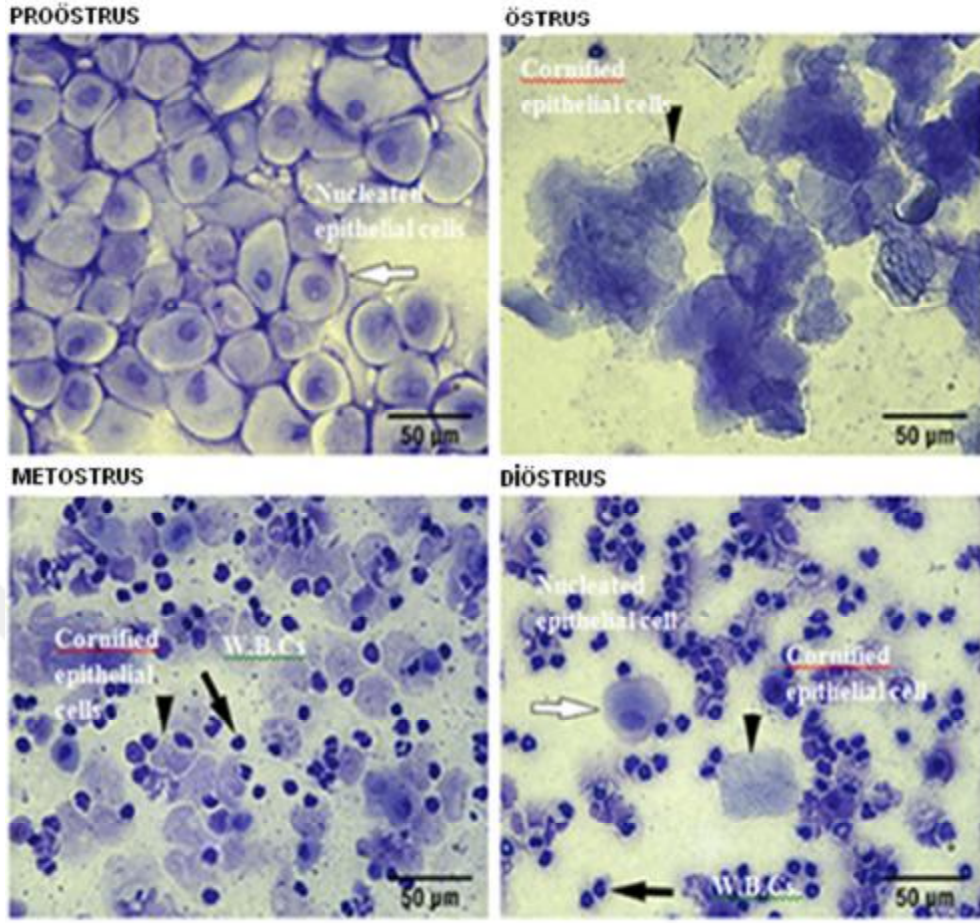
LH salınımının aktivasyonu ile puberte başlamaktadır (25). Pubertenin başlaması biyolojik yaştan daha çok vücutta belirli bir boy ve kiloya ulaşma ile olmaktadır (22). Bununla birlikte vajinal açıklığın görülmesi pubertayı işaret eder. Dişi ratlarda vajinal açıklık 33-42. gün görülmektedir (22). Pubertenin başlamasıyla cinsel olgunluğa ulaşmış sıçanlarda üreme siklusu dört dönemde gerçekleşir; proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus bu dönemlere verilen isimlerdir. Bu döngünün tamamı ortalama 4-5 gün sürmektedir (şekil 5) (20,26).

Proöstrus: bu dönemde vajinal sürüntü incelendiğinde düzgün sınırları olan yuvarlak nükleuslu tek veya grup şeklinde görülen epitelyum hücreleri görülür. Ortalama 12 saat sürer ve bu dönemin sonunda çoğunlukla çiftleşme için erkek kabul edilmeye başlar (20,27).

Östrus: bu dönemde vajinal sürüntü incelendiğinde şekilsiz, köşeli, nükleusları küçülmüş veya tamamen yok olmuş (kornifiye hücre) çok sayıda büyük hücreler görülür. Bu evre ortalama 9-15 saat sürer ve çoğunlukla çiftleşme bu dönemde gerçekleşir (28).

Metöstrus dönemi; ovulasyondan sonra görülür, ortalama 21 saat sürer ve çiftleşme gerçekleşmez. Aynı oranda lökosit, kornifiye ve çekirdekli epitel hücreler ile karakterizedir (28).

Diöstrus dönemi: üreme siklusunun en uzun dönemidir ortalama 57 saat sürmektedir. Lökosit ve nükleuslu birkaç epitelhücre ile karakterizedir (28).



Şekil 5. Dişi sıçanlarda östrus siklusu (30)

### 2.3. İnfertilite

İnfertilite, herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın aynı partnerle, düzenli vajinal seksüel ilişkiye rağmen en az 12 ay boyunca gebelik elde edilememesi durumu olarak tanımlanmaktadır (31). Canlılığın temel prensiplerinden olan üreme gerçekleştirilemediği takdirde çiftler arasında önemli psikolojik sorunlar görülebilmektedir. Özellikle tanının konamaması veya tedavisi olmayan klinik problemlerin olması çiftler üzerinde sarsıcı hasarlarla sonuçlanabilmektedir (32).

İnfertilite primer ve sekonder infertilite olarak ikiye ayrılır. Daha önce gebelik öyküsü olmamışsa primer, en az bir kere gebelik öyküsü varsa sekonder infertilite olarak tanımlanır (33).

İnfertilite modern çağın hastalığı olma yolunda hızla ilerlemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada 15 ile 49 yaşları arasındaki kadınlarda

çocuk sahibi olmak için klinisyene başvuran kadın sayısı 1980 yılında %9, 1995' de yaklaşık %15, 2010 yılında ise %12 olarak bildirilmiştir (34,35). Ülkemizde 2008 yılında yapılan bir tarama çalışmasında bu oran %12,2 olarak belirlenmiştir (36).

Bir kadının gebe kalma ihtimali ile farklı toplumların gebe oranları ayrı başlıklar altında incelenmektedir. Bir popülasyonda belli bir zaman aralığında gebe kadın oranı 'Fekundabilite' olarak tanımlanır. Bir kadının tek menstrüel siklusa canlı doğum elde etme kabiliyetine ise 'Fekundite' denir (37). Yaşın ilerlemesi ve gebeliğin gerçekleşmediği siklus sayısının artması fekundabilite oranını azaltır (38,39). Fekundite kabiliyetini ve fekundabilite oranını etkileyen patolojik nedenler olabilmektedir. Gebe kalmayı önleyen patolojik faktörler infertilite nedeni olarak tanımlanmaktadır.

İnfertilitenin en sık sebepleri; ovulatuvar bozukluk, tubal, servikal ve uterin faktörler, erkek infertilitesi ve nedeni açıklanamayan infertilitedir. Uterin patolojileri bu sebepler arasında en seyrek görülendir. Yaşla birlikte her bir faktörün görülme sıklığında değişmektedir. Örneğin; genç kadınlarda ovulasyon bozukluklarına daha sık rastlanırken, tubal ve servikal faktörler genç ve yaşlılarda eşit sıklıkta görülmektedir. Erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite ise yaşlı çiftlerde daha sık görülmektedir. İnfertilite tedavisine başlamadan önce çiftlere 12 ay boyunca düzenli cinsel birleşme tavsiye edilir. Ancak 35 yaş üstü, oligo/amenorik, uterin, tubal hastalığı ya da endometriozisi olan, abdominal ve pelvik cerrahi geçiren kadınlarda bu süre beklenmeden tedaviye başlanmalıdır (40).

#### **2.4. Prolaktin, Hiperprolaktinemi ve İnfertilite ile İlişkisi**

PRL hipofiz ön lobundan salgınır ve salgınının kontrolü hipotalamusun inhibe edici etkisi altındadır (41). PRL ilk defa yalancı gebelik oluşturulan tavşanlarda süt üretimini tetikleyen hormon olarak bulunmuştur (42). İnsanda hipotalamus hipofiz çalışmalarının artmasıHPG aksında rol alan hormonların keşfini kolaylaştırmıştır. Bu çalışmalar sayesinde PRL insanda ilk defa 1971 yılında ortaya çıkarılmıştır (43). İlerleyen zamanlarda çeşitli biyokimyasal yöntemler ile PRL'nin kan değeri tespit edilir hale gelmiştir. Bu gelişmeyle birlikte prolaktinin düşük, yüksek ve normal kan değerleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (42-44). 1977 yılında Shome ve Parlow isimli araştırmacılar prolaktinin yapısı konusunda detaylı bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonunda PRL'nin 198 amino asitten oluşan 23.500 dalton ağırlığında bir

hormon olduğunu göstermişlerdir (44). Dört büyük  $\alpha$ -heliksten oluşan üç boyutlu yapısı bulunmaktadır (45). PRL geni 6p22.3 kromozom bölgesinde lokalizedir. 5p13.2 kromozom bölgesinde kodlanan PRL (PRL-R) reseptörü transmembran proteindir ve sitokin reseptör ailesine aittir (46,47). Sıçanlarda ise PRL geni 17p12 kromozom bölgesinde kodlanmışken, PRL-R geni 2q16 kromozom bölgesinde yer almaktadır (48).

PRL salınımının önemli düzenleyicileri hipotalamusta oluşan prolaktin inhibe edici faktör (PIF) ve dopamindir. Dopamin, laktotrop hücrelerdeki dopamin reseptörlerine bağlanarak hücre içine geçer ve granüler lizozomal aktiviteyi artırır, böylece prolaktin yıkımını artırarak kan prolaktin düzeyini düşürür. Tiroit düzenleyici hormon (TRH) doza bağımlı bir mekanizma ile prolaktin salınımını arttırıcı etki yapmaktadır. Bu fonksiyonu nedeniyle prolaktin salgılatıcı faktör (PRF) olarak rol oynadığı düşünülmektedir (49,50). Prolaktin salınımının pozitif etkileyicisi olan TRH dışında serotonin, vasopressin, vazoaaktif intestinal peptid, oksitosin, prostoglandinler, kolesistokinin, opiatlar, östrojenler, histamin ve noradrenalin gibi maddelerin de prolaktin salınımını uyarıcı etkisi bulunmaktadır (49). Prolaktin ve östrojen arasındaki kompleks bir ilişki vardır. Östrojenler laktotrop hücrelerin dopamin hassasiyetlerini azaltarak ve TRH reseptör sayısını artırarak prolaktin salınımını indüklerler. Diğer etki yolu ise; laktotropları doğrudan etkileyerek prolaktin gen transkripsiyon ve ekspresyonunu, mitotik aktivite ile DNA sentezini etkileyerek prolaktin seviyelerini yükseltmektedir (51,52). Fiziksel stimülasyon ile de salınım artabilmektedir. Emzirme sırasında meme başının ve koitus sırasında serviksin uyarılması nöroendokrin refleks yanıtına neden olarak PRL salınımını indüklerler. Hipotalamusun preoptik bölgesinin nöroendokrin refleks yanıtında rol aldığı düşünülmektedir. Serum prolaktin seviyesi, beslenme, koku, stres ve ışık gibi çeşitli fizyolojik değişkenlerden etkilenmektedir. PRL psikolojik stres faktörlerinden daha çok fizyolojik stres faktörlerine yanıt vermektedir (53).

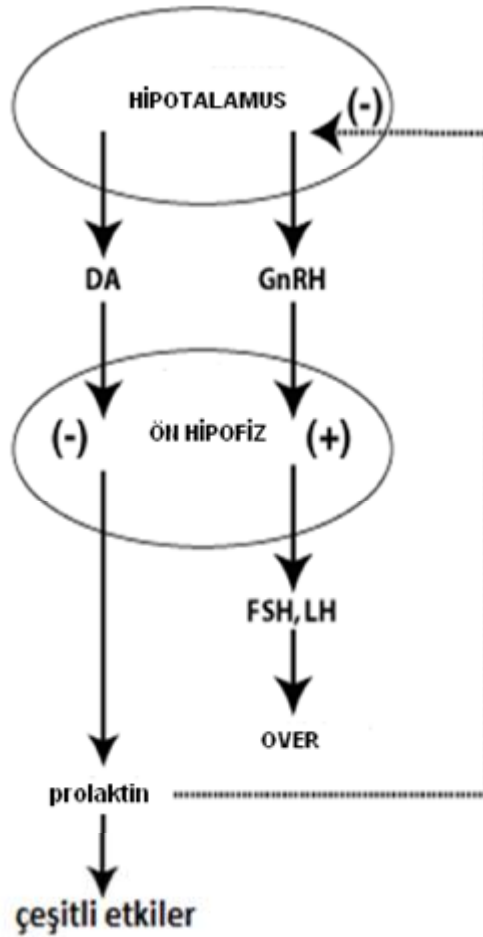
PRL üreme çağındaki kadınlarda puberte yıllarında meme gelişiminde, gebelik sırasında amniyon sıvısının ozmoregülasyonu ve fetüs akciğerinde sürfaktanların gelişiminde, memenin büyümesinde, doğumla birlikte laktasyonun sağlanmasında etkilidir (42). Fonksiyonu nedeniyle PRL'nin salındığı hücreler laktotrop hücreler olarak adlandırılmıştır. Yapılan son çalışmalar PRL salınımı ile dopaminerjik sistem arasında bir ilişki olduğunu göstermekle birlikte mekanizması tam olarak

aydınlatılamamıştır. Dopaminin prolaktin sentezini azalttığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada prolaktinin inhibe ettiği görülen Prolaktin İnhibe Edici Faktörü (PIF) izole ederek yapısı incelemiş ve Dopamin ve Nöradrenalin yapılı olduğu bildirilmiştir (54). Tavşanlarda yapılan farklı bir çalışmada doğrudan dopamin uygulandığında deneklerde PRL düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Benzer çalışmalarda dopaminin hipofiz üzerine baskılayıcı etki ettiğive dopamin reseptörlerinin bloke edilmesiyle bu baskılayıcı etkinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (41,54). TRH hipotalamik dopamin salınımını azaltarak PRL salınımını uyarır (55).Fizyolojik nedenler, patolojik sebepler veya bazı hastalıklar prolaktin düzeyinde artışa neden olarak prolaktin artışıyla sonuçlanmaktadır. Prolaktinin dopamin ile düzenlenmesi konusunda yapılan deneysel çalışmalarda doğrudan dopamin blokajına neden olanmetaklopramid gibimaddeler ile dopaminin PRL üzerinde oluşturduğu baskılayıcı etki ortadan kaldırılmış ve kan PRL düzeyi yükseltilmiştir.(16,54).

Yapılan birçok çalışma prolaktinin reproduktif fonksiyon üzerine önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda prolaktinin sentezinin olmadığı knockout deney hayvanları kullanılmıştır. Bir çalışmada transgenik dişi farelerin (PRL sentezleyemeyen) tamamının infertil olduğu gösterilmiştir. Tekrarlanan erkek fareler ile çiftleşme döngülerinde üreme olmadığı ve aynı zamanda östrus siklusunda bozulma meydana geldiği görülmüştür. Tüm bu çalışmalar prolaktinin üremede önemli rolü olduğunu göstermiştir (56).

Klinik olarak hiperprolaktinemi, plazma prolaktin seviyesinin erkeklerde 18 ng/mL ve kadınlarda 30 ng/mL üzerinde olmasıdır (57). Günümüzde hiperprolaktinemi, klinikçiler tarafından sadece PRL ile ilişkili patolojiler açısından ilgilenilmektedir, bu da PRL hakkındaki bilgilerimizin eksik olmasına yol açmaktadır. Patolojik hiperprolaktinemi PRL seviyesinin normal aralığın üzerinde olması durumu olarak tanımlanır. Normal popülasyonda görülme oranı %0,4 iken, infertilite şikayeti olan kadınlarda bu oran %17' ye çıkmaktadır (2,58).Gebelik ve laktasyon durumlarında da bu seviye artabilir fakat bu durum fizyolojiktir. Patolojik hiperprolaktineminin esas nedeni hipofiz bezindeki laktotrop hücrelerde tümör oluşumudur ve bu artmış hücre sayısı yükselen PRL'nin kaynağını oluşturur. Patolojik hiperprolaktinemi kadınlarda amenore ve galaktoreye, erkeklerde impotansa ve her iki cinste de libido kaybına ve infertiliteye yol açar(59). Hiperprolaktineminin diğer bir etkisi gonadal

disfonksiyondur. Yapılan bir çalışmada Hiperprolaktinemili hastalarda sekonder amenorenin %20-30 civarında olduğu bildirilmiştir (41, 60). Artmış PRL GnRH üzerinde üzerinde negatif etki oluşturarak LH ve FSH salınımını azaltır ve ovulasyonu bozar (şekil 6). Özellikle LH pikinin oluşamaması anovulatuvar sıklusa neden olmaktadır (61).



Şekil 6. Prolaktin salınımının kontrolü (62)

Hiperprolaktinemi hastalarının %85-90' nı sentetik dopamin analogları ile tedavi edilerek artmış PRL hormonunun etkileri azaltılmaktadır (59). Hipofiz tümörünün cerrahi müdahale ile boyutunun küçültülmesiyle kandaki PRL seviyesi normalize edilir ve hiperprolaktinemisinin sistemik etkileri ortadan kaldırılır. Antipsikotik tedavilerin de hiperprolaktinemiye düzelttiği bilinmektedir (63). Yüksek PRL'nin dopamin agonistleri

kullanılarak düşürülmesiyle LH üzerinde oluşan baskının kalktığı ve birkaç ay içinde siklusun normaleştiği bildirilmiştir (64).

## 2.5. Kisspeptin

Kisspeptinler isimlerini iki farklı kaynaktan almışlardır. KiSS sözcüğündeki “ss” takısı baskılayıcı dizi anlamına gelen ‘suppressor sequence’ tan almıştır. Ki ön eki ise; gen bölgesi Pensilvanya/ Hershey’de keşfedildiği için bu yörenin meşhur Kiss çikolatasına ithafen eklenmiştir (65). KiSS-1 geni kromozom 1 (1q32) bölgesinde kodlanmaktadır. Sıçanlarda bu gen 13 (13q13) numaralı kromozomda bulunmaktadır (66). SSS de yaygın olarak eksprese olan bu genin sonraki çalışmalarda kalp, beyin, karaciğer, akciğer, iskeletkası, böbrek, pankreas ve plasenta da ifade edildiği gösterilmiştir (67, 68). Sıçanlarda benzer anatomik dağılım görülmekle birlikte hipotalamus ve beyin sapı yoğun bulunan yerlerdir (68). Kiss-1 proteini 145 amino asitlik öncü bir protein olarak sentezlenir. Daha sonra çeşitli uzunluklarda farklı ürünlere dönüşür (69). KiSS1 geni ürünlerinin meme kanseri ve melanoma gibi kanserlerde metastaz baskılayıcı özellik göstermesi nedeniyle 54 amino asitlik gen ürününe “metastin” (kisspeptin54) ismi verilmiştir. Yapılan çalışmalar bu geninin tek ürünü olmadığını tespit edilmiş ve bu ailenin hepsi “kisspeptinler” (kisspeptin-14, kisspeptin-13 ve kisspeptin-10 ) olarak adlandırılmıştır (67, 70).



Şekil 7. Kisspeptin geni ve ürünleri: kisspeptin-54, kisspeptin-14, kisspeptin-13, kisspeptin-10.(71)

KISS1 geni tarafından kodlanan prepro-kisspeptin 145 aminoasitten oluşup 19 aminoasit sinyal-peptidi ve merkez 54 aminoasit mevcuttur (74). Protein 65-68. pozisyonda ve 121-124. amino asitler arasındaki noktadan kesilmesi sonucunda yeni oluşan proteinin C-terminal ucu amidleştirilir. Amidleştirilmiş olan bu kısım GPR54 reseptörüne bağlanmadan sorumludur (67,69,72,73).

GPR54 reseptörü, G proteini kenetli reseptörler (GPCR) ailesinin bir üyesidir. Çoğunlukla santral sinir sisteminde (SSS) bulunmakla birlikte periferik dokularda da gösterilmiştir. GPR54 reseptörünü kodlayan gen 1999 yılında keşfedilmiştir (67,68).

GPR54 reseptörünün plasenta, hipofiz, pankreas ve medulla spinaliste yüksek oranlarda ekspres edildiğinin keşfiyle birlikte bu reseptörün özellikle endokrin fonksiyonları olup olmadığı konusunda çalışmalar yapılmaya başlamıştır (68).

KISS1 gen proteinlerinin tutunduğu GPR54 reseptörü günümüzde çoğunlukla KISS1R (kisspeptin reseptörü) olarak kullanılmaktadır (75).

Kisspeptinlerin GPR54 reseptörü ile olan fizyolojik ilişkileri "kisspeptin-GPR54" sistemi olarak adlandırılmakta ve puberte başlangıcı ile üreme üzerine önemli roller üstlendikleri düşünülmektedir (76,77). Kisspeptinler C-terminal ucunda yer alan amino asit dizisi ile ilgili reseptöre bağlanarak fosfolipaz-C aktivasyonu yapar ve inozitol 1,4,5 trisfosfat artışı meydana getirir, bu artış kalsiyumun artışı tetikler ve ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) ile p38 mitojen ile aktive edilen proteinkinaz (p38 MAPK) yollarının aktivasyonu sağlanır (78). KISS1 reseptörünün tam anlaşılması amacıyla fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların kullanıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır, bu çalışmalarda mutasyonun pubertal gelişim ve üreme aktivitelerinde kayıp ile birlikte hipogonadotropik hipogonadizme neden olduğu gösterilmiştir (72,79-81). Sonuç olarak bu reseptörün puberte ve üremede normal GnRH aktivitesi için gerekli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. KISS1R mutasyonları sonucunda seksüel gelişim, üreme ve fertilitiyi etkileyen tüm farklı fenotipik gelişim bozuklukları, KISS1-KISS1R sisteminin GnRH nöronlarının aktif olduğu, fetal gelişim, neonatal yaşam, puberte ve erişkinlikte de gerekli olduğunu düşündürmektedir (82). Kisspeptinlerin mevsimsel üreme döngülerinde de rol aldıkları yapılan hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir. Farelerde ışık süresi ve pubertenin başlama zamanı arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışmada ışık miktarı ve süresi ile Kiss1 mRNA ekspresyonu karşılaştırılmıştır. Çalışmada, ışık miktarının azalmasıyla Kiss1 ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir.

Aynı araştırmacılar pineal bezin çıkarılmasıyla kisspeptin üzerinde oluşan baskılayıcı etkinin ortadan kalktığını göstermiştir. Bu çalışma ile Kisspeptinlerin üremenin metabolik kontrolünde melatonin aracılı bir düzenleme ile etkili olabilecekleri görüşü ortaya çıkmıştır (75).

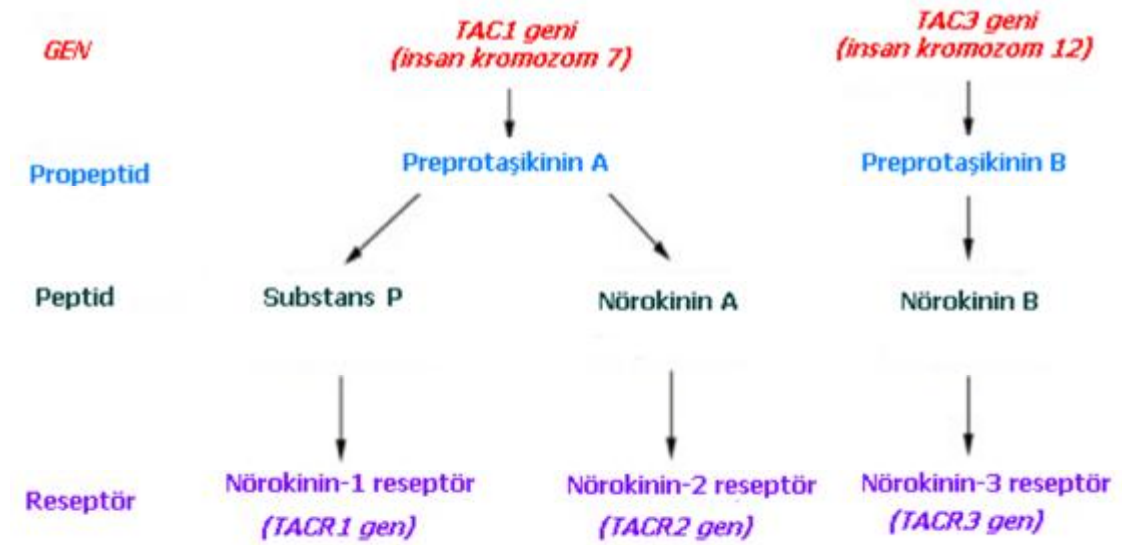
Kisspeptinlerin GnRH nöronları üzerine olan etkileri de araştırılmıştır. Bu çalışmalarda kisspeptin ve reseptörünün ekspresyonu ile östrojen, LH ve FSH miktarları değerlendirilmiştir (75).

Ovarian siklusun foliküler fazında artan östrojen seviyelerinin ovulasyondan sorumlu olan LH salınımına neden olacak şekilde hipotalamustan GnRH salınımını artırdığı bilinmektedir (75).

Östrojenin GnRH nöronları üzerindeki pozitif geribildiriminin anteroventral periventriküler, median preoptik ve periventriküler preoptik çekirdeklerde bulunan ve östrojen alfa reseptörü (Er $\alpha$ ) ekspresyondan nöronlar aracılığı ile dolaylı yoldan olduğu düşünülmektedir. GnRH nöronları ile ilişkide olan nöronların kisspeptin de dahil olmak üzere glutamat, GABA ve nörotensin salınımında bulundukları gösterilmiştir (83). Bulgular artıka hipotalamik kisspeptin nöron topluluklarının rol dağılımlarındaki önemli bir noktanın da östrojen bağımlı GnRH ve LH salınımlarının düzenlenmesi olduğu ortaya çıkmaktadır (84).

## **2.6. Nörokinin**

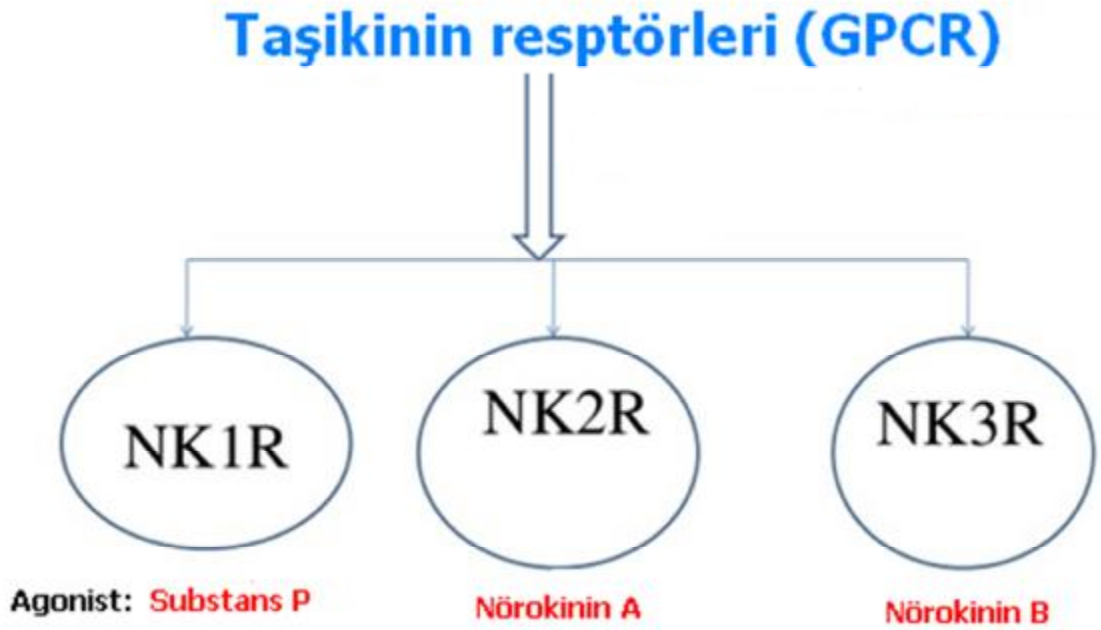
NKB taşıkinin olarak adlandırılan nöropeptit ailesinin önemli üyelerinden biridir. Taşikininler, nörotransmitter/nöromodülatör olarak görev yaparlar ve vücudumuzda birçok farklı dokuda etki gösterirler. Nörokininler A ve B olmak üzere ikiye ayrılırlar. NKA ve NKB nin keşfi yaklaşık 3 dekat önce yapılmıştır (85). TAC3 geni insanlarda NKB'yi kodlayan genidir ve 12q13.3 bölgesinde bulunmaktadır (86). Sıçanlarda ise bu gen 7q22 bölgesinde bulunmaktadır (87). Pronörokinin B olarak sentezlenir ve proteolitik bir dizi olaydan sonra NKB halini alır (85).



Şekil 8. NK geni ve reseptörleri (88)

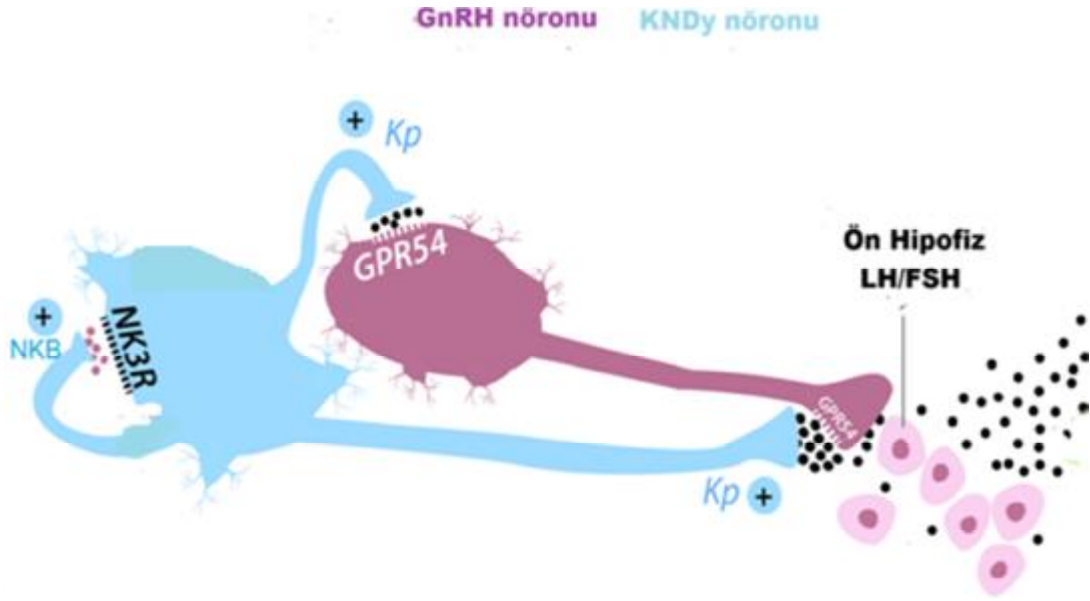
TAC3 geninin kodlandığı nöronlar insanda infundibular nükleus, anterior hypothalamik bölge, septal bölge, amigdala, neokorteks gibi farklı bölgelerde olduğu tespit edilmiştir (89,90). NKB ratlarda Tac2 tarafından kodlanır ve bu geni içeren nöronlar serebral korteks, hipokampus, amigdala başta olmak üzere beynin birçok bölgesinde bulunmaktadır (91).

NK'lar G protein kenetli reseptörler üzerinden etki gösterirler. NK1R, NK2R ve NK3R olmak üzere 3 çeşit taşikinin reseptörü vardır (şekil 8). Bu reseptörlerden NKB'ye afinitesi en yüksek olan NK3R' dir (92,93). NK3R, insandaTACR3 geni ile kodlanırken sıçanlarda Tacr3 ile kodlanmaktadır. Bu reseptörün insanlarda santral sinir sisteminde, uterus ve plesentada kodlandığı bildirilmiştir (92, 94,95).



Şekil 9. Taşikinin reseptörleri (96)

Gonadal steroidlerin kontrolü SSS' de pozitif ve negatif geri bildirim mekanizması ile yapılmaktadır. Bu geri bildirim mekanizmasının merkezinde GnRH bulunmaktadır (97). GnRH sentezinden sorumlu nöronlar herhangi bir uyarı olmaksızın tek başlarına gonadal steroidlerin sentezine etkiye bulunamazlar. Bu durumda seks steroidlerinin kontrolü için GnRH ciddi bir önem arz etmektedir. Navaro ve arkadaşlarına göre NKB gonadal aksis üzerine olan muhtemel etkisini GnRH hormonları üzerinden göstermektedir (şekil 10). Bu görüşü birçok çalışma desteklemektedir. TAC3/Tac2 mRNA larının susturulduğu deneklerde östradiol ve testosteron değerlerinin düştüğü bildirilmiştir. Bu hormonların düşmesi GnRH üzerinden baskıya neden olmaktadır. Sadece NKB yi kodlayan mRNA' nın değil aynı zamanda NK3R yi kodlayan mRNA' nın da susturulması bu steroidlerin azalmasına yol açmıştır (98).NKB ve reseptörünün üreme sistemi üzerine etkileri güncel araştırma konusu olma özelliğini korumaktadır.



**Şekil 10.** Nörokinin, Kisspeptin ve gonadotropin ilişkisi (99)

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada deney hayvanı kullanmak için gerekli olan izin; Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi-Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından 21.08.2013 tarihindeki 8. oturumun 1 numaralı kararı ile verilmiştir.

#### 3.1. Gruplandırma ve Deneysel Uygulama

Bu çalışmada 12-16 haftalık, 200-250 gr ağırlığında dişi Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçan sayısı toplam 40 adettir. 10 adet kontrol, 10 adet sadece serum fizyolojik (SF) uygulanmış grup, 20 adet metaklopramid (Metpamid, Sifar Türkiye) uygulanmış grup olmak üzere 3'e ayrılmıştır. Aşağıdaki tabloda gruplar ve yapılacak uygulamalar özet olarak gösterilmektedir.

**Çizelge 1.** Deney hayvanlarının gruplandırılma biçimleri

|        | Serum Fizyolojik uygulaması | Metaklopramid uygulaması | Ekspresyon değerlendirilmesi | Gebeliğin takibinin yapılması |
|--------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Grup 1 | -                           | -                        | +                            | -                             |
| Grup 2 | +                           | -                        | +                            | -                             |
| Grup 3 | -                           | +                        | +/-                          | +/-*                          |

\*Fertilizasyonun olup olmayacağının takibi için erkek sıçanlarla bir araya getirilecek hayvanlar.

Grup 3' e kontrol ve SF uygulanan gruptan farklı olarak 20 adet sıçan dahil edilmiştir. Gruplara yapılacak olan deneysel uygulamalar bittikten sonra Grup 3' ten rastgele seçilen 10 sıçan ayrı kafeslere alınarak erkek sıçanlar ile bir araya getirilmiştir. Böylece metaklopramid uygulamasından ne kadar süre sonra tekrar gebe kalıp kalmayacağı, yapılan uygulamanın geri dönüşlü olup olmayacağı değerlendirilmiştir.

Sıçanlar standart diyetle beslenip, sınırsız su verilerek ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık programı (saat 07:00-19:00 arası aydınlık) uygulanarak bakıldı. Kan prolaktin düzeyini yükseltmek amacıyla 3 numaralı gruba günde tek doz 2,2 mg/kg metaklopramid 14 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulanarak çalışmada

amaçlanan kan prolaktin düzeyine ulaşıldı (16).Metaklopramid dopanmin reseptör antagonistidir ve dopamin blokajı yaparak kan PRL düzeyini artırır (16).

2 numaralı gruba aynı sürede,aynı yolla ve aynı miktarda sadece serum fizyolojik uygulandı. İntraperitoneal uygulamanın oluşturabileceği stres faktörü kan prolaktin düzeyine ve gen ekspresyonuna etki edebilir, bu uygulama ile oluşabilecek stres faktörünün prolaktin düzeyleri ve gen ekspresyonu üzerine etkisinin olup olmadığı gözlemlendi. İki haftalık metaklopramid uygulama periyodunun ardından tüm gruplara ait sıçanların kan prolaktin düzeyleri; prolaktin ELİSA immunoassay kiti kullanarak ölçüldü ve elde edilen değerler karşılaştırıldı. 1 ve 2 numaralı gruplarda yer alan sıçanlar ile 3 numaralı gruptan rastgele seçilen 10 sıçan mRNA ekspresyon çalışmalarındakullanıldı.

### **3.2. Hayvansal dokuların elde edilmesi**

Sıçanlar, intramüsküler olarak 75 mg/kg Ketamin (Richter pharma ag, Avustralya), 5 mg/kg xylazine (Alfazyne, Hollanda) ile anestezi edildiler.

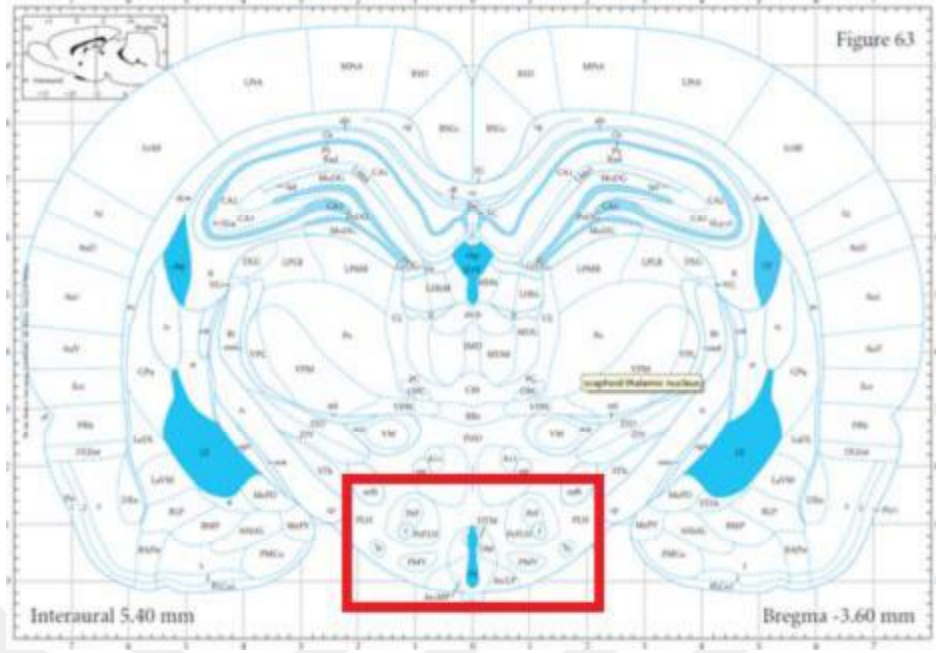
Sıçanların parmak kısırtma yanıtları ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda anestezi altına girdiklerinin anlaşılmasıyla;

Prolaktin düzeylerini belirlemek için sıçan ventriküllerinden kalp kanı alındı (şekil 11). Alınan kan antikoagulanlı tüplere aktarıldı. Santrifüj edilen kanın serum kısmı ayrılarak analiz yapılmak üzere -80 °C de saklandı. Serumlardaki prolaktin düzeyleri elisa kiti (Sunred biologic tec. Co, Çin) kullanılarak ölçüldü.



**Şekil 11.** Sıçandan ventriküler kanın alınması

Kan alma işleminin hemen ardından deneklerden hipotalamus dokusu alınmıştır (şekil 13). Doku alma işleminde referans olarak bregma talası kullanılmıştır. Bregma atlasına göre hipotalamus -4,08mm / - 1,80mm koordinatlarında yer almaktadır (şekil 12) (100).



Şekil 12.Bregma atlasına göre hipotalamik alan (100)



Şekil 13.Sıçan beyni

### 3.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılan Vivantis RNA izolasyon kiti protokolü:

1. 350 µl Buffer TR pellet üzerine eklenerek vortekslenir.
2. Karışım homojenizasyon kolonuna aktarılır. En yüksek devirde 2 dakika santrifüj edilir. Kolon içindeki örnek kullanılır.
3. Örneğin üzerine 350 µl %80'lik alkol eklenir, pipetaj yapıldıktan sonra RNA bağlayıcı kolona aktarılır.
4. RNA bağlayıcı kolon 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir kolonun alt kısmında toplanan pellet atılır.
5. RNA bağlayıcı kolana 500 µl yıkama tamponu ilave edilir. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun alt kısmında toplanan pellet atılır.
6. 70 µl DNaz I parçalama karışımı RNA bağlayıcı kolona aktarılır ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir.
7. RNA bağlayıcı kolona 500 µl inhibitör removal tampon eklenir. En yüksek hızda 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolonun alt kısmında toplanan pellet atılır.
8. RNA bağlayıcı kolana 500 µl yıkama tamponu ilave edilir. 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun alt kısmında toplanan pellet atılır. Bu işlem 2 defa tekrarlanır.
9. Kolon 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir. Kolonun alt kısmında toplanan pellet atılır.
10. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktırılarak membranın üzerine 40-60 µl RNAaz içermeyen su ilave edilir. 1 dakika bekletildikten sonra 10.000 x g' de 1 dakika santrifüj edilir. Mikrosantrifüj tüpünde toplanan RNA -20 °C veya -80 °C'de saklanır.

### 3.4. cDNA Eldesi

Applied Biosystems High- Capacity cDNA Reverse Transcription kiti kullanılarak RNA' lardan cDNA elde edildi. Hassasiyetleri yüksek olan Revers transkripsiyon (RT) kit RT master mix buz üzerinde hazırlandı (Çizelge 2). 2xRT master mixten 10'ar mikro litre PCR tüplerine alındıktan sonra her tüpe pipetaj

yapılarak üzerlerine 10 mikro litre RNA ilave edildi. Numaralandırılan PCR tüpleri Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek Çizelge 3’de gösterilen program uygulandı.

**Çizelge 2.** 2xRT master mix bileşenleri ve miktarları.

| 2x RT Master Mix                   | Kullanılan miktar |
|------------------------------------|-------------------|
| 10X RT Buffer                      | 2.0 µl            |
| 25XdNTPkarışımı                    | 0.8 µl            |
| 10X RT Random Primer               | 2.0 µl            |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1.0 µl            |
| Nükleaz içermeyen Su               | 4.2 µl            |
| 1 reaksiyon için toplam hacim      | 10 µl             |

**Çizelge 3.** cDNA eldesi için Thermal Cycler’da kullanılan program

|          | 1.Aşama   | 2.Aşama    | 3.Aşama  | 2.Aşama |
|----------|-----------|------------|----------|---------|
| Sıcaklık | 25 °C     | 37 °C      | 85 °C    | 4 °C    |
| Zaman    | 10 dakika | 120 dakika | 5 dakika | ∞       |

### 3.5. Real Time RT- PCR

Real-time reverse-transkriptaz (RT) PCR; başlangıç miktarına göre oluşan, son PCR ürününün kuantifikasyonunun özgün, hassas ve diğer metodlara göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir. Bu yöntemde; her bir PCR döngüsünde oluşan flouresan ışınımı aracılığı ile son ürün miktarı tespit edilebilir (101). Çalışmamızda kullanılan genler için tasarlanan FAM boyalı prob içeren TaqMan Gene Expression Assay kullanarak Real-time RT- PCR reaksiyonunu gerçekleştirdik. TaqMan Real-time PCR aşamasında üç çift primer kullanılır. 1. ve 2. primerler her bir DNA iplikciği üzerinden replikasyonu başlatır. 3. prob ise bu primerler arasından bir zincire bağlanır. Prob, iki modifiye edilmiş baz içerir; 5’ ucunda bulunan floresan reporter (R) ve

3'ucundaki floresan quencher (Q). Replikasyon esnasında 1. primer yönünde uzayan DNA iplikciği, probun 5'ucunu zincirden ayırır ve polimerazın eksonükleaz aktivitesi floresan reporter molekülünü probdan ayırır. Quencherden ayrılan reporter molekülü floresan ışıma yapar. Oluşan floresan ışınımın başlangıç miktarına göre oranı, her bir PCR döngüsünde ölçülür (101).

Real Time PCR karışımı Çizelge 4'teki gibi hazırlandı. Hazırlanan PCR karışımı 96'lık plate'e 20'şer mikrolitre aktarıldı. Plate'in üstü şeffaf filmle kapatıldı ve üzerine koruyucu örtü yerleştirildi. Plate Applied Biosistem 7500 Real time- PCR cihazına yüklendi. Cihazın programı Çizelge 5'teki gibi ayarlandı.

**Çizelge 4.** Real Time RT- PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

| PCR Reaksiyon karışım bileşenleri    | 20 µl reaksiyon hacmi için |
|--------------------------------------|----------------------------|
|                                      | Tek reaksiyon              |
| 20X TaqMan Gene Expression Assay     | 1.0 µl                     |
| 2X TaqMan Gene Expression Master Mix | 10.0 µl                    |
| cDNA örneği                          | 4.0 µl                     |
| RNAaz- içermeyen su                  | 5.0 µl                     |

**Çizelge 5.** Applied Biosystems 7500 real -time RT-PCR için kullanılan Program

| Isı Döngüsü Koşulları |               |               |
|-----------------------|---------------|---------------|
| Aşama                 | Sıcaklık (°C) | Zaman(dd: ss) |
| Hold                  | 50            | 2:00          |
| Hold                  | 95            | 10:00         |
| Döngü<br>(40 Döngü)   | 95            | 0:15          |
|                       | 60            | 1:00          |

### 3.6. Real Time RT- PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ekspresyon düzeylerini belirlemek için Threshold Cycle (CT) veya crossing points (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür(102). Eşik-değer döngü (Threshold Cycle = C T) değeri bize; ürünlerdeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. CT; sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır (101). Hedef genlerimizin ekspresyon düzeylerini belirlemek için  $\Delta C_p$  yöntemi kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirildi (103):

$\Delta C_p = C_p \text{ hedef gen} - C_p \text{ referans gen}$

$\Delta \Delta C_p = \Delta C_p \text{ muamele edilen} - \Delta C_p \text{ kontrol}$

$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_p}$

### 3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler özetlenirken, değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma medyan (min-maks) değer olarak ifade edilmiştir. Düşük sayıda örneklem ölçümü sebebiyle ve veri setinde alt gruplarda standart sapmaların yüksek olması sebebiyle normal dağılım varsayımına gerek duyulmayan parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Üç veya daha fazla grup karşılaştırmasında Kruskal-Wallis Test, daha sonra ikili karşılaştırmalarda veya ekspresyon değerleri için direkt 2 grup içeren karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Değişkenlerle ilgili değerlendirmelerde  $p < 0,05$  olduğu durumlar

istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Değerlerin gösteriminde kutu grafiği (box-plot) gibi grafiksel yaklaşımlardan yararlanılmıştır. Verilerin analizinde IBM SPSS ver. 19 paket programı kullanılmıştır.



#### 4. BULGULAR

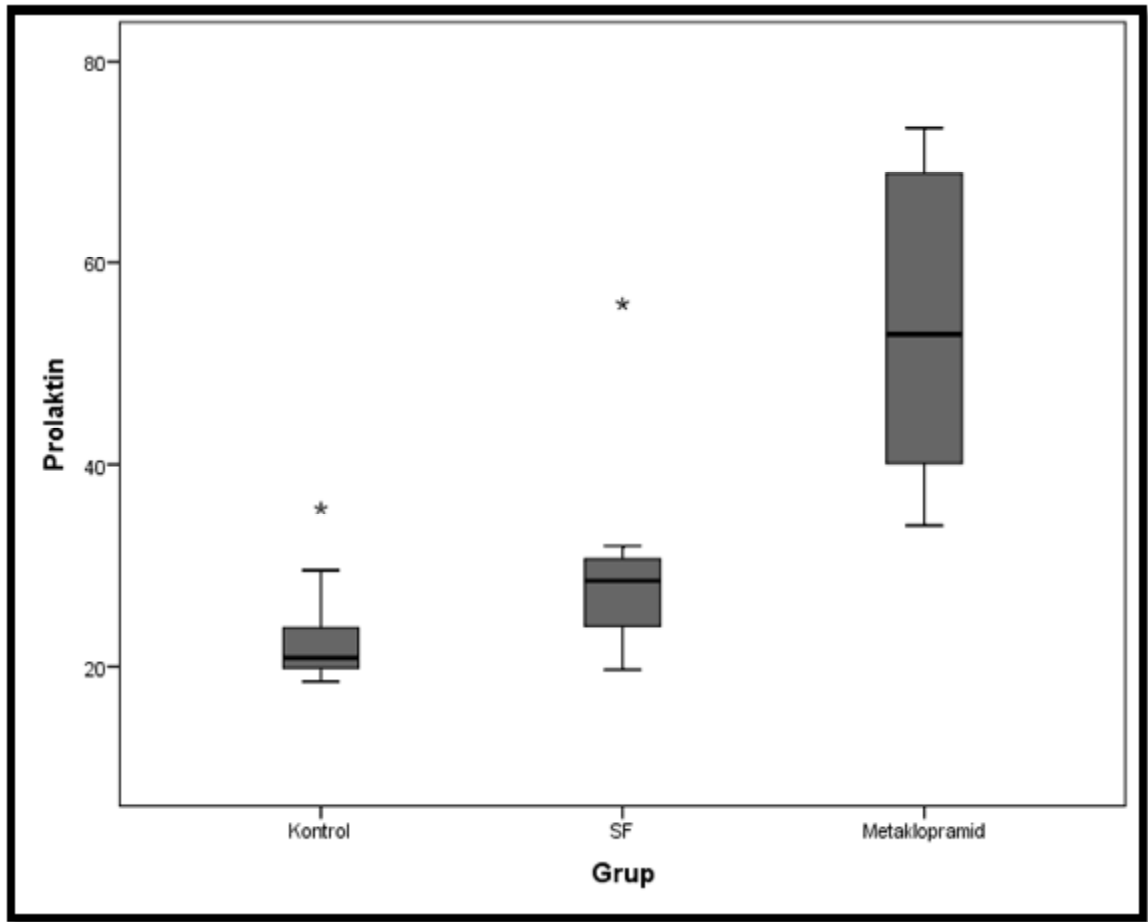
Bu tez çalışmasında ilgilenilen parametreler 3 grupta çalışılmıştır. Bu gruplar kontrol grubu, SF grubu ve Metaklopramid grubudur. İlk iki grupta 10 denek, 3. grupta 20 denek bulunmaktadır. Üç grupta prolaktin düzeyleri ölçülmüştür. Ekspresyon düzeylerini belirlemek için ThresholdCycle (CT) veya crossingpoints (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülmüştür. Kiss1, KissrR, NKB ve NKBR için tasarlanan mRNA gen ekspresyon assay ile genlerin kontrol grubundaki, SF uygulamasındaki ve Metaklopramid uygulamasındaki düzeylerine bakıldı. Ekspresyon düzeyleri  $\Delta C_p$  yöntemi kullanılarak hesaplandı. Prolaktin düzeyleri gruplarda karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ( $p < 0,001$ ) ve sonuçlar çizelge 6'da sunulmuştur.

**Çizelge 6.** Gruplarda prolaktin düzeylerinin dağılımı

|                      | <b>Prolaktin düzeyleri<br/>(ng/mL)</b> | <b>p (çoklu karşılaştırma)</b> |
|----------------------|----------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Kontrol</b>       | 23,0 $\pm$ 5,4<br>20,9(18,5-35,7)      | -                              |
| <b>SF</b>            | 29,7 $\pm$ 10,0<br>28,5(19,7-55,9)     | 0,364*                         |
| <b>Metaklopramid</b> | 53,3 $\pm$ 14,3<br>53,0(34,0-73,4)     | <b>&lt;0,001* , 0,017**</b>    |
| <b>p</b>             | <b>&lt;0,001</b>                       |                                |

\*kontrol ile karşılaştırma , \*\* diğer iki grubun karşılaştırılması

Analiz sonucunda prolaktinin düzeyinin en yüksek olduğu grubun deney grubu (Metaklopramid) olduğu, en düşük olduğu grubun kontrol grubu olduğu söylenebilir. Grafiks gösterimlerden yararlanılarak değerler şekil 14'te sunulmuştur.



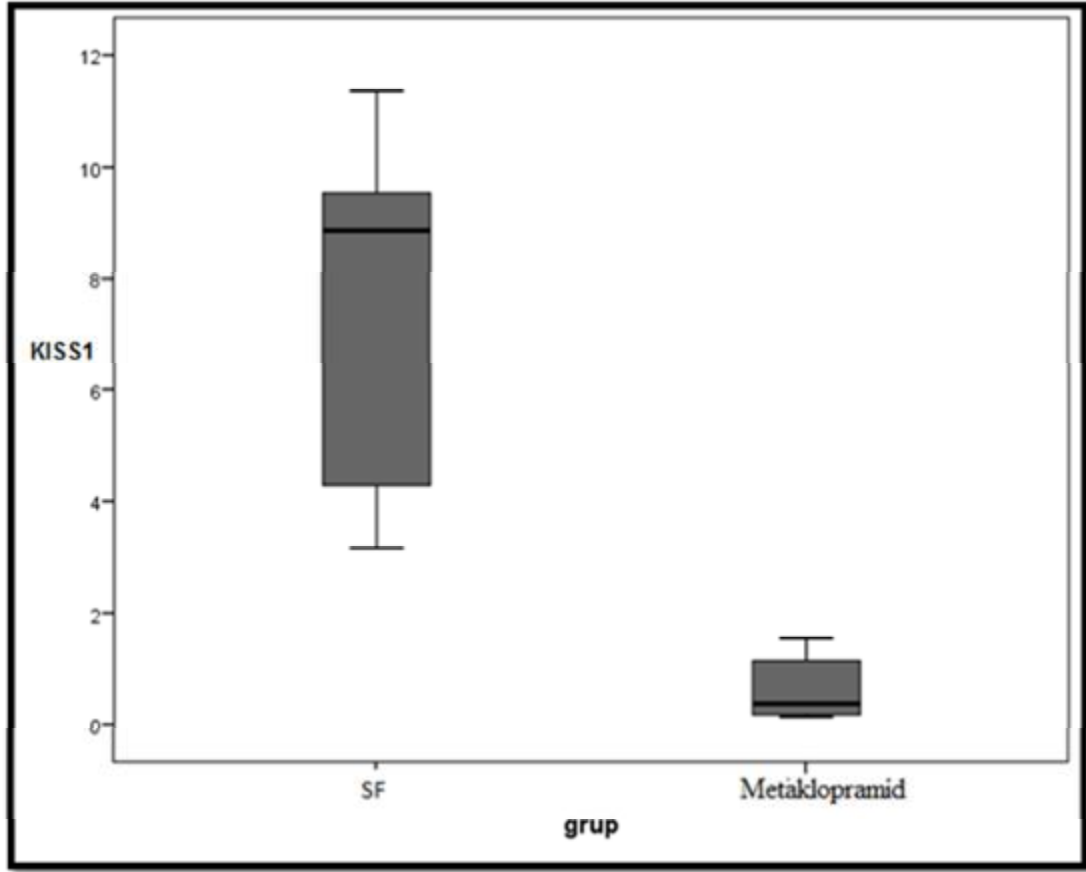
Şekil 14. Prolaktin düzeyleri

Delta Cp yöntemi kullanılarak hesaplanan Kiss1mRNA ekspresyon düzeyleri çizelge 7’ de sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ( $p < 0,001$ ).

Çizelge 7. SF ve Metaklopramid gruplarında Kiss düzeyleri

|               | KISS1 düzeyleri          | p      |
|---------------|--------------------------|--------|
| SF            | 7,6±3,1<br>8,9(3,2-11,3) | <0,001 |
| Metaklopramid | 0,6±0,5<br>0,4(0,1-1,5)  |        |

SF grubunda Kiss1 ekspresyon düzeylerinin Metaklopramid grubuna göre daha yüksek olduğu söylenebilir ve değerler grafiksel olarak şekil 15'te sunulmuştur.



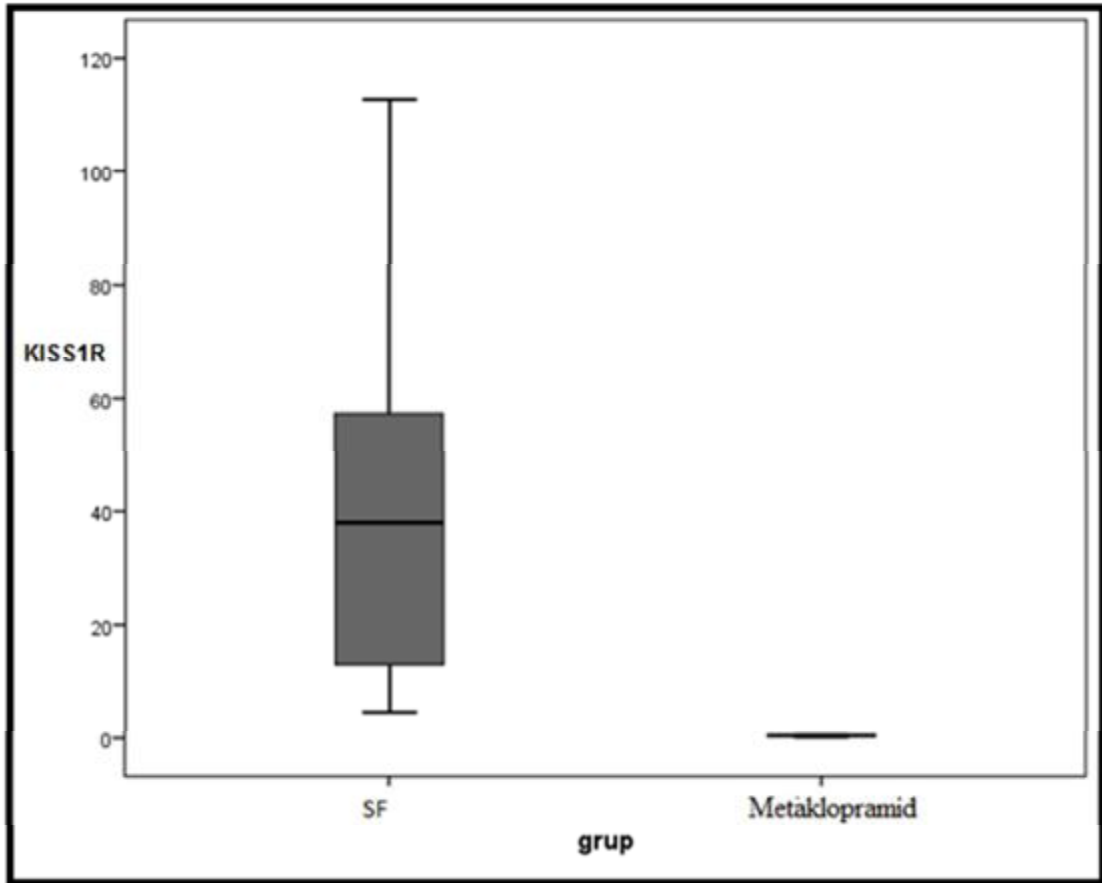
Şekil 15. KISS1 düzeyleri

Delta Cp yöntemi kullanılarak hesaplanan Kiss1R ile ilgili ekspresyon düzeyleri çizelge 8' de sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ( $p < 0,001$ ).

**Çizelge 8.** SF ve Metaklopramid gruplarında KiSS1R düzeyleri

|                      | <b>KiSS1R düzeyleri</b>      | <b>p</b>         |
|----------------------|------------------------------|------------------|
| <b>SF</b>            | 43,3±35,1<br>38,0(4,5-112,6) | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Metaklopramid</b> | 0,4±0,2<br>0,5(0,1-0,7)      |                  |

SF grubunda KiSS1R ekspresyon düzeylerinin Metaklopramid grubuna göre daha yüksek olduğu söylenebilir ve değerler grafiksel olarak şekil 16’da sunulmuştur.



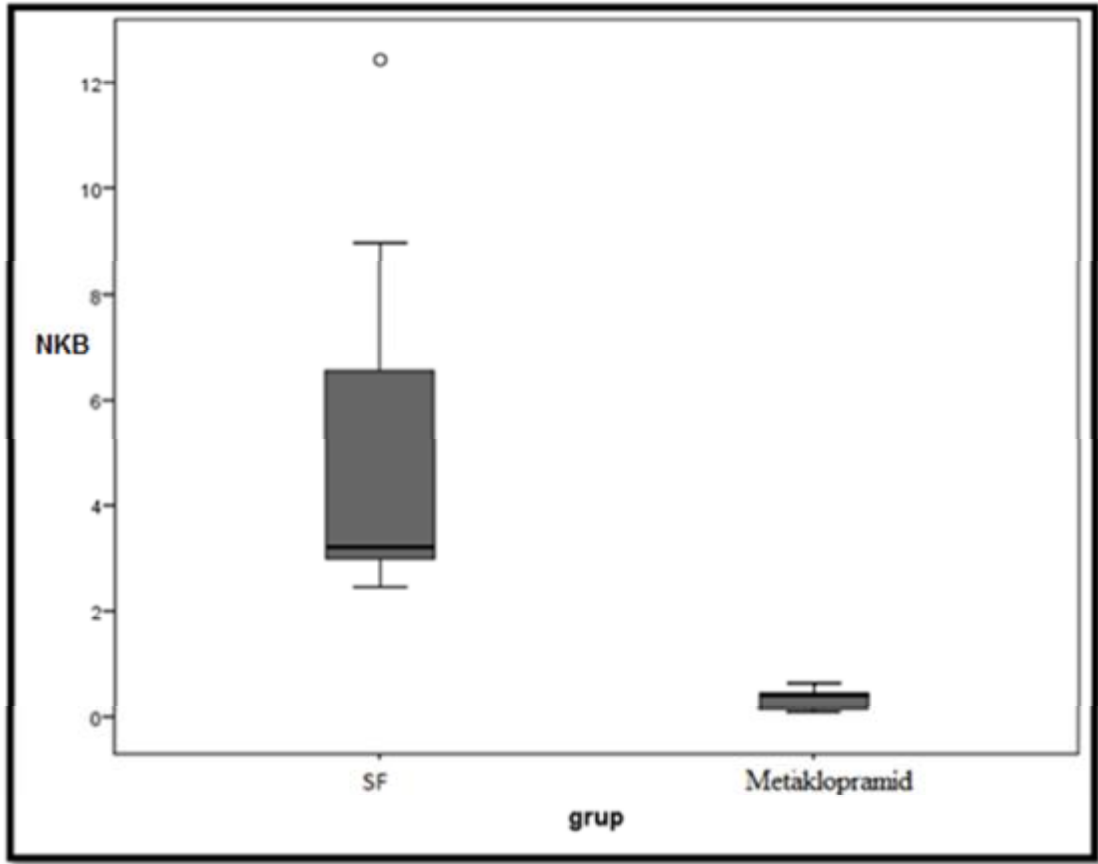
**Şekil 16.** KiSS1R düzeyleri

Delta Cp yöntemi kullanılarak hesaplanan NK ile ilgili ekspresyon düzeyleri çizelge 9’ da sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmıştır ( $p<0,001$ ).

**Çizelge 9.** SF ve Metaklopramid gruplarında NK düzeyleri

|                      | <b>NKB düzeyleri</b>     | <b>p</b>         |
|----------------------|--------------------------|------------------|
| <b>SF</b>            | 5,0±3,3<br>3,2(2,5-12,4) | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>Metaklopramid</b> | 0,3±0,2<br>0,4(0,1-0,6)  |                  |

SF grubunda NKB ekspresyon düzeylerinin Metaklopramid grubuna göre daha yüksek olduğu söylenebilir ve değerler grafiksel olarak şekil 17’de sunulmuştur.



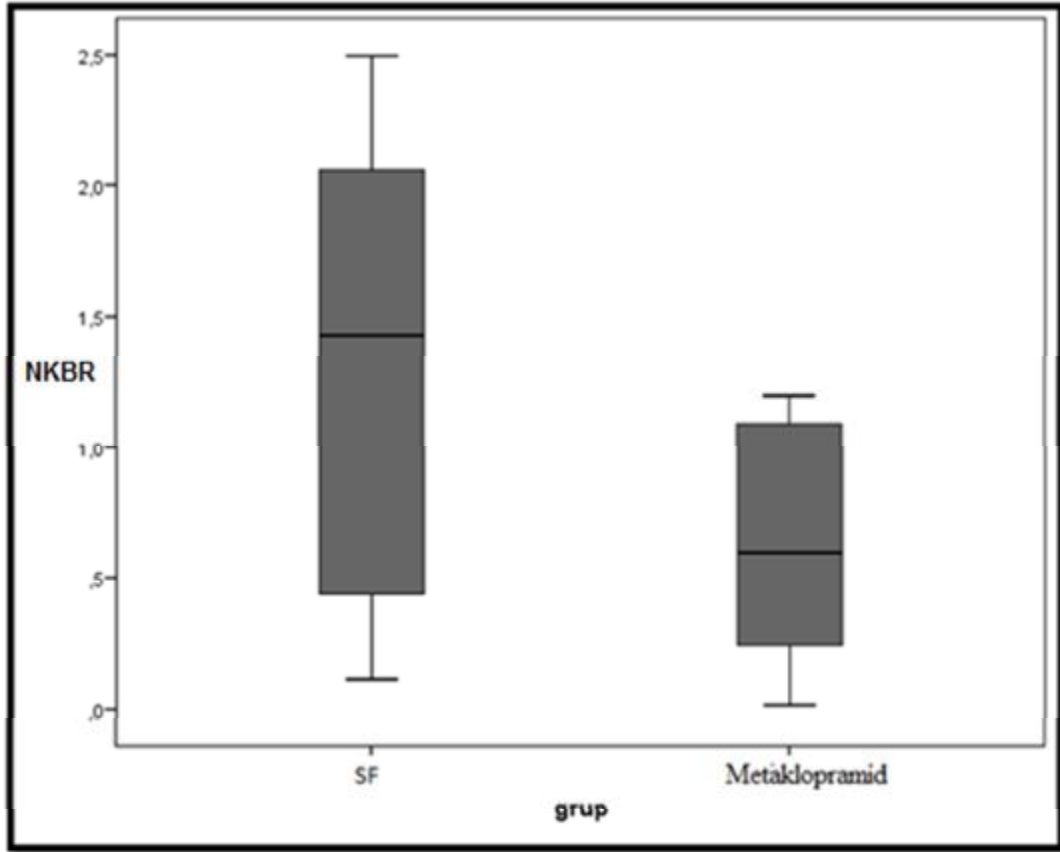
Şekil 17. NKB düzeyleri

Delta Cp yöntemi kullanılarak hesaplanan NKR ile ilgili ekspresyon düzeyleri çizelge 10' da sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ( $p=0,052$ ). Gruplar arasındaki farklılık için  $p$  değerine bağlı olarak sınırda anlamlılık olduğu da söylenebilir (borderline significant).

Çizelge 10. SF ve Metaklopramid gruplarında NKBR düzeyleri

|               | NKBR düzeyleri          | p     |
|---------------|-------------------------|-------|
| SF            | 1,3±0,9<br>1,4(0,1-2,5) | 0,052 |
| Metaklopramid | 0,6±0,5<br>0,6(0,0-1,2) |       |

SF grubunda NKR ekspresyon düzeylerinin Metaklopramid grubuna göre daha yüksek olduğu fakat bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı söylenebilir. Değerler grafiksel olarak şekil 18’te sunulmuştur.



Şekil 18. NKR düzeyleri

Çizelge 11. Metaklopramid uygulaması bittikten sonra deneklerin ilk yavruyu verme süreleri

|              | 1.-2. ay | 2.-3. ay | 3.-4. ay |
|--------------|----------|----------|----------|
| Denek Sayısı | -        | 8        | 2        |

## 5. TARTIŞMA

İnfertilite, herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın aynı partnerle, düzenli, vajinal seksüel ilişkiye rağmen 12 ay içerisinde gebelik elde edilememesi durumu olarak tanımlanmaktadır (31). İnfertilite modern çağın hastalığı olma yolunda hızla ilerlemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada 15 ile 49 yaşları arasındaki kadınlarda çocuk sahibi olmak için klinisyene başvuran kadın sayısı 1980 yılında %9, 1995' de yaklaşık %15, 2010 yılında ise %12 olarak bildirilmiştir (34,35). Ülkemizde 2008 yılında yapılan bir tarama çalışmasında bu oran %12,2 olarak belirlenmiştir (36). İnfertilite, hormonal düzensizlikler, bireysel farklılıklar gibi bir çokfaktörden kaynaklanabilmektedir. Prolaktin de infertilite ile ilişkili olan hormonlardan birisidir.

Prolaktin 90 yıl önce keşfedilen ve fonksiyonu hakkında oldukça farklı çalışmalar yapılmış olan bir hormondur (104). Hipofizden salınan polipeptid yapıdaki bu hormon laktasyon üzerine yaptığı uyarıcı etki nedeniyle prolaktin ismini almıştır. Bu özellik PRL (104) ve PRLR (PRLR;105) eksikliği olan hayvan modellerinde açık bir şekilde görülmüştür. Bu çalışmalar aynı zamanda memelilerde PRLR/STAT5 yolunun esas rolünü anlamamıza ışık tutmuştur (106). Kalıcı PRLR sinyal iletilme başarısızlığı olan germline modeller; beyin, metabolizma, immün sistem, davranış şekilleri ve elektrolit dengesi gibi PRL nin etkili olduğu diğer fizyolojik olayları anlamaya da yardımcı olmaktadır (107). Yapılan birçok çalışma prolaktinin reproduktif fonksiyon üzerine önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda prolaktinin sentezinin olmadığı knock-out deney hayvanları kullanılmıştır. Horseman ve arkadaşları 1997 yılında yaptıkları çalışmada PRL sentezi yapamayan transgenik dişi farelerin tamamının infertil olduğunu göstermiştir. Tekrarlanan erkek fareler ile çiftleşme döngülerinde üreme olmadığı ve aynı zamanda östrus siklusunda bozulma meydana geldiği görülmüştür. (108). Bazı çalışmalarda ise deneklerin PRL düzeyleri arttırılmıştır (16,23,41). Böylece yüksek PRL düzeylerinin etkileri incelenmiştir. Biz de çalışmamızda PRL sentezi üzerinde inhibitör etki gösteren dopamini bloke eden kimyasal (metaklopramid) kullanarak deneklerimizde kan prolaktin düzeylerini arttırdık. Böylelikle eksojen PRL uygulaması yerine deneklerimizde endojen olarak PRL miktarını arttırdık. Hormonal salınımın sadece fizyolojik değil aynı zamanda psikolojik

faktörlerden etkilenebileceği düşünüldüğünden enjeksiyonun oluşturacağı stresin PRL salınımı ve gen ifadesine etkisini anlamak amacıyla kontrol dışında SF uygulanmış grubu da değerlendirdik. Tüm deneklerimizden aldığımız kan serumu ile elde ettiğimiz bulgulara göre, metaklopramid uygulaması yaptığımız grubun serum PRL düzeyi kontrol ve SF uygulanan gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ). Çalışmamızda oluşturduğumuz deney düzeneğinde PRL yükselmesinin endojen ve geri dönüşlü olmasına özen gösterdik. Bu yüzden metaklopramid uygulamasını takiben erkek sıçanlar ile bir araya getirdiğimiz dişi sıçanların belli bir süre gebe kalmadıklarını, daha sonra tüm sıçanlarda gebeliğin meydana geldiğini gözlemledik. Rastgele seçilip erkek sıçanlarla bir araya getirilen 10 denekte de ilaç tedavisi almayan sıçanlara kıyasla gebe kalımının gecikme sebebinin kanda yüksek miktardaki PRL' nin ovulasyon üzerine olan inhibitör etkisi ile alakalı olduğunu düşünmekteyiz. Nitekim 10 denegın tamamının tedavi bitiminden 3 ay sonra yavrulanmış olması, PRL' nin ovulasyona olan baskısının kalkmasıyla ilgili olacağı düşüncemizi desteklemektedir.

Bachelot ve Binart yaptıkları araştırmada PRL' nin anovulasyona yol açmasını GnRH üzerinde oluşturduğu negatif etki ile LH ve FSH miktarının düşmesine bağlamaktadır. Ancak PRL' nin bu negatif etkiyi hangi yolu kullanarak yaptığı veya bu etkiye aracılık eden nöropeptitlerin olup olmadığı konusunda aydınlatıcı bir açıklama yapılamamıştır (109).

Ancak yakın geçmişte yapılan çalışmalar, prolaktinin Kiss1 genini ifade eden belirli bir hipotalamik nöron popülasyonu üzerinde hareket ederek üreme eksenini modüle edebileceğine dair yeni kanıtlar sağladı (110,111). Kisspeptinleri kodlayan genlerde veya kisspeptin reseptöründe (KISS1R) fonksiyon kaybı mutasyonları insanda ve hayvan modellerinde ergenlik ve infertilitenin bozulmasına neden olur (112). Topaloğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Kiss1 mutasyonlu deneklerin tamamında hypogonadotropik hipogonadizm geliştiğini göstermiştir (113). Bazı çalışmalar ise KISS1'i ifade eden nöronların doğrudan prolaktin seviyeleri tarafından modüle edildiğini göstermiştir (114). Prolaktin ve kisspeptin sistemi arasındaki etkileşimin HPG aksında belirgin bir etkiye neden olduğuna dair daha fazla kanıt KISS1 mRNA ekspresyonu üzerine prolaktin infüzyonunun sonuçlarını değerlendiren çalışmalarla sağlanmıştır. Bu çalışmaların tamamında sistemik veya intraserebroventriküler prolaktin infüzyonunun hipotalamik KISS1 ekspresyonunu baskıladığı ve plazma LH düzeylerini

düşürdüğü bildirmiştir (108,110). Kisspeptinler, GnRH nöronlarının en önemli aktivatörleri olarak bilinirler (115) ve hem insanlarda hem de hayvan modellerinde LH ve FSH sekresyonunda güçlü bir uyarıma neden olabilirler (116,117). Bu bilgiye dayanarak, in vitro fertilizasyon tedavisi gören kadınlarda kisspeptin uygulamasının yumurta olgunlaşması üzerine etkileri de test edilmiştir. Jayesane ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kisspeptin enjeksiyonunun yumurtanın olgunlaşmasını, subfertiliteye sahip kadınlarda döllenme, embriyo implantasyonu ve başarılı canlı doğum ile sonuçlanacak kadar tetikleyebildiğini bildirmişlerdir (118). Sonigo ve arkadaşları prolaktin indüksiyonuyla infertilite oluşturdıkları dişi farelerde tedavi amacıyla Kisspeptin uygulaması yaptıktan sonra elde ettikleri sonuçları bildirmişlerdir. Bu çalışmada prolaktin infüzyonuyla PRL değerleri yükseltile farelere günlük kisspeptin enjeksiyonu yapmışlardır. Çalışmaya göre prolaktinin yol açtığı GnRH üzerindeki baskılayıcı etkinin ortadan kalktığı ve ovulasyonun düzeldiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, Sonigo ve Cols, Kisspeptinlerin GnRH sekresyonuna etkilerini göstermek için dişi farelerden elde edilen hiptalamik dokulardan GnRH miktarı ölçülmüş ve prolaktin maruziyetinden sonra GnRH miktarının önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir (119). Bu nedenle, KISS1 gen ekspresyonunun azaltılmasının, hiperprolaktinemi sırasında gonadotropin sekresyonunun bastırılmasının birincil nedeni olduğu düşünülmektedir. Biz de yaptığımız çalışmada PRL yüksekliğinin sıçanlarda Kisspeptin ekspresyonunu nasıl etkilediğini gösterdik. Çalışmanın sonunda Kisspeptin ekspresyonunun PRL' si yüksek olan grupta kontrol ve SF gruplarına göre anlamlı derecede düştüğü görülmüştür ( $p<0,001$ ). Aynı zamanda KISSR ekspresyonu da kontrol ve SF grubuna göre anlamlı derecede ( $p<0,001$ ) düşük bulunmuştur.

GnRH' nın salınımının düzenlenmesi üreme ekseninin merkezi kontrolündedir (120). Bu önemli görev puberte ve fertilite araştırmaları için ilgi odağı olmaktadır. GnRH salınımında önemli rolü olduğu kanıtlanan Kisspeptin bu görevi üstlenmiş tek nöropeptit değildir. NKB' nin de GnRH üzerine etkileri olduğu son yıllarda yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. GnRH hormonal düzenlenmede merkezi bir role sahip olduğu halde GnRH sentezi yapan nöronlar cinsiyet hormonlarının geri bildirimine doğrudan cevap verememektedir. Yapılan çalışmalar GnRH nöronlarında östrojen alfa ve androjen reseptörlerinin olmadığını yalnızca östrojen beta reseptörlerinin eksprese edildiğini göstermiştir (121).

NKB ve kisspeptinin etkileşimlerinin gonadotropik eksenin normal işleyişi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Kisspeptin salınımının pulsatil olduğunu ve bu atımların maymun ve keçi çalışmalarına dayalı olarak GnRH / LH atımlarıyla korele olduğuna karar verme konusunda inandırıcı kanıtlar vardır (122,123). Sonuç olarak, KNDy (kisspeptin, Nörokinin, Dinorfin) nöronlarından NKB'nin aynı nöronun NK3R'sinde, tekrarlayan teminatlarla ve diğer komşu KNDy nöronlarında otosinaptik olarak etki eder (122,124,125). NKB'nin bu eylemi, her kisspeptin darbesinden sonra benzersiz bir GnRH darbesi sunmak için ARC (arkuat nükleus) içinde kisspeptinin senkronize bir şekilde salınmasını uyandırır. Bu olasılık ARC'deki KNDy nöronlarını çevreleyen yoğun NKB ile uyumludur (126,127).

Kisspeptinler ile NKB' nin sıkı nöroanatomik dağılım bakımından ilişki içinde olması ve her ikisinin de GnRH stimülasyonu ve gonadotropin salınımında etkili olduğunun gösterilmesi bu iki nöropeptitin puberte ve fertilité için birbirlerinin etkilerine aracılık edebileceği düşünülebilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler de bu tezi desteklemektedir. NKB' nin ekspresyonu metaklopramid uygulanan deneklerde kontrol ve SF gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır ( $p<0,001$ ). Bu azalmayı Kisspeptin ve Kisspeptin R' de de elde ettik. NKBR ekspresyon değeri meteklopramid uygulanan grupta kontrol ve SF grubuna orana azalmış olsa da bu anlamlılık sınırda kalmıştır ( $p=0,052$ ). Bu sonuçlar NKB' nin de Kisspeptin gibi yüksek PRL ile ekspresyonun azalmasına, PRL nin GnRH üzerinden gonadotropin salınımı ve ovulasyon üzerine olan etkilerine aracılık edebileceğine inanamaktayız.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda 40 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deneklerden 3 farklı grup oluşturuldu. Birinci grup kontrol, ikinci grup SF uygulanan grup ve üçüncü grup ise metaklopramid uygulaması ile PRL düzeyleri yükseltilecek grup. Her üç grubun kan prolaktin düzeyleri ve KISS1, KISS1R, NK, NKR mRNA ekspresyonları incelendi. Bu çalışmanın sonunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

1. Metaklopramid uygulanan grubun kan PRL düzeyi kontrol ve SF uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ).
2. Metaklopramid uygulanan grubun KISS1 ekspresyon düzeyi kontrol ve SF uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ).
3. Metaklopramid uygulanan grubun KISS1R ekspresyon düzeyi kontrol ve SF uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ).
4. Metaklopramid uygulanan grubun NK ekspresyon düzeyi kontrol ve SF uygulanan gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ).
5. Metaklopramid uygulanan grubun NKR ekspresyon düzeyi kontrol ve SF uygulanan gruba göre düşmüş olsa da anlamlılık oranı sınırda kalmıştır ( $p=0,052$ ).

Elde edilen veriler literatür ile uyumlu olup, PRL' nin HPG aksı üzerinde oluşturduğu inhibitör etkiyi açıklamak için fikir vericidir. Ancak bu döngünün bütünüyle anlaşılması için yeterli değildir. Bunun için ek olarak GnRH nöron aktiviteleri, hipotalamik bölgenin histopatolojik değerlendirilmesi ve uterusunda bulunan reseptör aktivitelerinin takip edilmesi önerilir.

## KAYNAKLAR

1. **Greenhall E, Vessey M.** The prevalence of subfertility: our view of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil. Steril*, **1990**; 54: 978–983.
2. **Biller BM, Luciano A, Crosignani PG, Molitch M, Olive D, Rebar R, Sanfilippo J, Webster J, Zacur H.** Guidelines for the diagnosis and treatment of hyperprolactinemia. *J Reprod Med* **1999**; 44(12):1075–1084.
3. **Atasü T, Kösebay D, Aksu MF.** Hiperprolaktinemi ve korpus luteum yetersizliği. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni, Özel sayı*, **1982**.
4. **Terasawa E, Fernandez DL.** Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*, **2001**; 22: 111–151.
5. **X, Yu H, Wei X, Zhou Y, Wang W, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J.** GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. *Neuroendocrinology*, **2007**; 86: 77–83.
6. **Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA.** Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocr Rev*, **2009**; 30: 713–743.
7. **Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M.** The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*, **2001**; 276: 34631–34636.
8. **Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M.** Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **2001**; 411; 613–617.
9. **Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL.** Minireview: Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin (KNDy) Cells of the Arcuate Nucleus: A Central Node in the Control of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology*. **2010**; 151(8):3479-89.
10. **Roseweir AK, Millar RP.** The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Hum Reprod Update*. **2009**; 15(2):203-12.
11. **Smith JT.** Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Research Reviews*, **2008**; 57:288.
12. **Castellano JM, Roa J, Luque RM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M.** Kiss-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: Physiologic roles and putative physiopathological implications, *Peptides*, **2009**; 30(1): 139-145.
13. **Roa J, Navarro VM, Tena-Sempere M.** Kisspeptin in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments, *Biol Reprod*, **2011**; 85(4); 650-660.
14. **Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN.** The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep, *Endocrinology*, **2010**; 151(1):301-11.
15. **Sonigo C, Bouilly J, Carré N, Tolle V, Caraty A, Tello J, Simony-Conesa FJ, Millar R, Young J, Binart N.** Hyperprolactinemia-induced ovarian cyclicity is reversed by kisspeptin administration, *2012*; 122(10): 3791-5.

16. **Glabowska S, Laszczynska M, Glabowski W, Wylot M.** Morphology of the epithelial cells and expression of androgen receptor in rat prostate dorsal lobe in experimental hyperprolactinemia. *Folia Histo chem Cytobiol*, **2006**; 44: 25-30.
17. **Koçak İ.** Kadın Üreme Fizyolojisi. Bölüm 4. syf: 33-45.
18. <http://www.tipfak.com/wp-content/uploads/2015/06/Kad%C4%B1n-genital-hormonlar-fizyolojisi.pdf>
19. **Widmaier EP, Raff H, Strang KT.** Vander insan fizyolojisi. 10. Baskı, İzmir: İzmir Güven Kitabevi, **2010**.
20. **Soylu SM.** Rat fizyolojisi. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **2001**; 431: 1-3.
21. **Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H.** Physiology of Reproduction. In GJ Krinke. New York: Academic Press, **2000**; 9: 145-176.
22. **Mülazımoğlu SB, İde T, Aslan S.** Ratlarda üreme. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **2012**; 39-44.
23. **Matagne V, Rasier G, Lebrethon MC, Gérard A, Bourguignon JP.** Estradiol stimulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in vitro: correlation with prenatal exposure to sex steroids and induction of sexual precocity in vivo. *Endocrinology*, **2004**; 145: 2775-2783.
24. **Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC.** The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit Messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, **1989**; 125: 917-924.
25. **White SS, Ojeda SR.** Changes in ovarian luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the rat. *Endocrinology*, **1981**; 109: 152-161.
26. **Krinke GJ.** The Laboratory Rat. New York: Academic Press, **2000**; 4(9): 45-173.
27. **Sharp PE, Laregina MC.** The Laboratory Rat. New York: CRC Press, **1998**; 2: 15-19.
28. **Baker DEJ.** Reproduction and Breeding. In: Baker, HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. *The Laboratory Rat*, New York: Academic Press, **1979**; 1: 153-168.
29. **Oba G, Aslan S, Kaymaz M.** Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vajinal sitolojinin kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2001**; 48: 51-57.
30. [http://vlabs.iitb.ac.in/vlabs-dev/labs/zoology\\_lab/labs/exp6/result.php](http://vlabs.iitb.ac.in/vlabs-dev/labs/zoology_lab/labs/exp6/result.php) (Erişim Tarihi: 25.11.2017 )
31. **Wallach EE.** The uterine factor in infertility. *Fertil Steril* **1972**; 23: 138-158.
32. **Araoye MO.** Epidemiology of infertility: social problems of the infertile couples. *West Afr J Med*, **2003**; 22: 190-196.
33. **McCarthy JJ Jr, Rockette HE.** Prediction of ovulation with basal body temperature. *J Reprod Med*, **1986**; 31(8): 742-7.
34. **Chandra A, Stephen EH.** Impaired fecundity in the United States: 1982-1995. *Fam Plann Perspect*, **1998**; 30(1): 34-42.
35. **Chandra A, Copen CE, Stephen EH.** Infertility service use in the United States: data from the National Survey of Family Growth, 1982-2010. *Natl Health Stat Report*, **2014**; (73): 1-21.

36. Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü (2009) Türkiye Nüfus ve sağlık araştırması, 2008. Hacettepe Üniversitesi nüfus etütleri enstitüsü, sağlık bakanlığı ana çocuk sağlığı ve aile planlaması genel müdürlüğü, Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı ve TÜBİTAK, Ankara, Türkiye.
37. **Speroff L.** Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. Williams & Wilkins, **2007**; 7: 84.
38. **Van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J.** Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *BMJ*, **1991**; 302: 1361-1365.
39. **Berek JS. İnfertilite. Adashi EY, Hillard PA. Novak Jinekoloji.** 12. Baskı, Nobel Kitabevi, **1998**: 918-925.
40. **Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Solues MR.** The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*, **1999**; 181: 952-957.
41. **Besser GM.** Hyperprolactinemia Hypogonadism Syndromes. *The Med J Australia Special Supp*, **1978**; 4: 14-17.
42. **Archer DF.** Physiology of prolactin. *Cl Obstet Gynecol*, **1980**; 23(2): 325-333.
43. **Hwang D, Guyda H, Friesen H.** Purification of human prolactin. *J. Bio. Chem*, **1972**; 247: 1955.
44. **Shome B, Parlow A.** Human pituitary prolactin. *J. Cl. Endocrinol. Metab*, **1972**; 45: 1112.
45. **Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME.** The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *J Mol Biol*, **2003**; 328: 1105-21.
46. **Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA.** Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J*, **1984**; 3: 429-37.
47. **Bazan JF.** Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1990**; 87: 6934-38.
48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24683> (Erişim Tarihi: 25.10.2017)
49. **Richards JS, Williams JJ.** Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): regulation by LH and PRL. *Endocrinology*, **1976**; 99: 1571-1581.
50. **Vekemans M, Delvoye P, L'Hermite M, Robyn C.** Serum prolactin levels during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, **1977**; 44: 989-993.
51. **Veldhuis JD, Evans WS, Stumpf PG.** Mechanisms that subserve estradiol's induction of increased prolactin concentrations: evidence of amplitude modulation of spontaneous prolactin secretory bursts. *Am J Obstet Gynecol*, **1989**; 161: 1149-1158.
52. **Petty RG.** Prolactin and antipsychotic medications: mechanism of action. *Schizophr Res*, **1999**; 35: 67-73.
53. **Freeman ME, Banks JA.** Hypothalamic sites which control the surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology*, **1980**; 106: 668-673.
54. **Uslu M.** Kadında Önemli Genital Sendromlar. Erzurum: Atatürk Üniv. Basımevi, **1982**.
55. **Werner L.** Les antiprolactines. *Actualies gynecolies. Sixieme serie* 91, **1975**.
56. **Horseman ND.** Prolactin. In DeGroot LJ, Jameson JL. *Endocrinology*. Philadelphia: WBSaunders, **2001**; 4: 209-20.

57. Nathan RS, Asnis GM, Dyrenfurth I, Halpern FS, Halbreich U, Ostrow LC. Plasmaprolactinandtestosteroneduringpenfluridoltreatment. *Lancet*, **1980**; 2: 94.
58. Crosignani PG. Management of hyperprolactinemia in infertility. *Journal of ReproductiveMedicine*, **1999**; 44: 1116–1120.
59. Molitch ME. Pituitarytumorsandpregnancy. *GrowthHormoneand IGF Research*, **2003**; 13: 38–44.
60. Bohnet, HG, Dahlen, HG, Wuttke, W, Schneider, HPG. Hyperprolactinemicanovulatorysyndrome. *J ClinEndocrinol Metab*, **1976**; 42: 132.
61. Bohnet H G, Dahlen HG, Schneider HPG. Hyperprolactinemiaandpulsatil LH function. *ActaEndocrinol (Kbh)* **1974**; 184: 109.
62. <https://courses.washington.edu/conj/bess/hyperprolactinemia/hyperprolactinemia.htm> (Erişim Tarihi: 20.10.2017)
63. Knegtering H, Van Der Moolen AE, Castelein S, Kluiter H, Van Den Bosch RJ. What are the effects of antipsychotics on sexualdysfunctionsandendocrinefunctioning? *Psychoneuroendocrinology*, **2003**; 28:109-123.
64. Marshall JC, Eagleson CA, McCartney CR. Hypothalamicdysfunction. *Molecularand Cellular Endocrinology*, **2001**; 183 29–32.
65. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. KisspeptinSignaling in the Brain. *EndocrRev*. **2009**; 30:713-43.
66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> (Erişim Tarihi: 20.10.2017)
67. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biologicalchemistry*. **2001**; 276:34631-6.
68. Lee JH1, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*, **1996**; 88:1731-7.
69. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. A KiSS store member. *TrendsEndocrinolMetab*, **2005**; 16: 249-50.
70. Cortés ME, Carrera B, Rioseco H, Pablo del Río J, Vigil P. The Role of Kisspeptin in the Onset of Puberty and in the Ovulatory Mechanism: A Minireview. *Journal of Pediatricand Adolescent Gynecology*, **2015**; 28: 286-91.
71. <http://d6igaq6njpgjh.cloudfront.net/content/physrev/92/3/1235/F2.large.jpg> (Erişim Tarihi: 30.11.2017)
72. Seminara SB1, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *New England Journal of Medicine*, **2003**; 349:1614-27.
73. Jayasena CN, Abbara A, Comninou AN, Nijher GM, Christopoulos G, Narayanaswamy S, Izzi-Engbeaya C, Sridharan M, Mason AJ, Warwick J, Ashby D, Ghatei MA, Bloom SR, Carby A, Trew GH, Dhillon WS. Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *J Clin Invest*, **2014**; 124: 3667-77.

74. **Tena-Sempere M.** GPR54 and kisspeptin in reproduction. Human reproduction update. **2006**;12:631-9.
75. **Kafa İM, Eyigör M.** Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, **2011**; 37 (1): 53-60.
76. **Dhillon WS.** Kisspeptin: a novel regulator of reproductive function. J Neuroendocrinol, **2008**; 20: 963–70.
77. **Plant TM.** The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. Eur J Endocrinol, **2006**; 155: 11–6.
78. **Colledge WH.** GPR54 and puberty. Trends Endocrinol Metab, **2004**; 15: 448–53.
79. **deRoux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E.** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA, **2003**; 100: 10972–6.
80. **Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'rahilly S, Aparicio SA.** Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab, **2005**; 90: 1849–55.
81. **Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, Dwyer A, Falardeau J, Ozata M, Van VG, Bouloux P, Hall JE, Hayes FJ, Pitteloud N, Martin KA, Welt C, Seminara SB.** Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol, **2006**; 155: 3–10.
82. **Chan YM, Broder-Fingert S, Seminara SB.** Reproductive functions of kisspeptin and Gpr54 across the life cycle of mice and men. Peptides, **2009**; 30: 42–8.
83. **Herbison AE.** Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). Brain Res Rev, **2008**; 57: 277–87.
84. **Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A.** Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. Neurosci Lett, **2006**; 401: 225–30.
85. **Fernandez C, Debeljuk L, Diaz E, Diaz Lopez B.** Age differences in NKA and SP from the rat hypothalamus, pituitary, pineal and striatum of the rat. Effect of melatonin. Peptides **2002**; 23: 941–5.
86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6866>. (Erişim Tarihi: 15.09.2017)
87. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/29191>. (Erişim Tarihi: 15.09.2017)
88. **Schank J, Heilig M.** Chapter Six - Substance P and the Neurokinin-1 Receptor: The New CRF. International Review of Neurobiology, **2017**; 136: 151-175.
89. **Alexander JM, McIntire DD, Leveno KJ, et al:** Selective magnesium sulphate prophylaxis for the prevention of eclampsia in women with gestation hypertension. Obstet Gynecol **2006**; 108(4):826-832
90. **Cunningham FG, Mac Donald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LJ, Hanks GDV, Clark SL.** Williams Obstetrics 21th edition **2001**; 567-609
91. **Haddad B, Sibai BM.** Chronic hypertension in pregnancy. Ann Med **1999**; 31(4):246-252
92. **North RA, Taylor RS, Schellenberg JC.** Evaluation of a definition of preeclampsia. Br J Obstet Gynaecol **1999**; 106(8):767-773.

93. **Chames MC, Livingston JC, İnvester TS,et al.** Late postpartum eclampsia: Apreventable disease? Am J Obstet Gynecol **2002**; 186(6):1174-1177
94. **Atrash HK, Konin LM, Lawson HW, Franks AL, Smith JC.** Maternal mortality inthe United States, 1979-1986. Obstet Gyneacol **1990**; 76: 1055-1060.
95. **Kelling JW, McCaw, Ashley DE, Goldin J.** Maternal mortality in Jamaica: Healthcare provision and causes of death. Int J Gynaecol Obstet **1991**;35: 19-27.
96. <https://www.slideshare.net/sumitkpal372/neuropeptides>(Erişim Tarihi:30.11.2017 )
97. **Lam C, Lim KH, Karumanchi A.** Circulating angiogenic Factors in the Pathogenesisand Prediction of preeclampsia. Hypertension **2005**;46: 1077-1085
98. **Jauniaux E and Nicolaides KH.** Placental lakes, absent umbilical artery diastolic flowand poor fetal growth in early pregnancy. Ultrasound Obst Gynecol **1996**; 7:141-144
99. <http://www.millendo.com/our-programs/mle4901.php>(Erişim Tarihi:30.11.2017 )
100. **Paxinos G, Watson C,.** The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, **2007**.
101. Real Time PCR. (<http://www.belgeler.com/blg/2bjg/taqman>)(Erişim Tarihi:30.11.2017 )
102. **Michael W.** Relative quantification International University Line. Erişim:(<http://www.genequantification.eu/pfaffl-rel-quan-book-ch3.pdf>) 2013.Erişim Tarihi: 22.11.2017
103. **Pfaffl M.** Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung BIO spektrum.Erişim: (<http://physio.wzw.tum.de/fileadmin/Forschung/2004/Pfaffl-04fa04-02.pdf>) 2013. Erişim Tarihi: 22.11.2017
104. **Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E & Dorshkind K** Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. EMBO Journal 16 **1997** 6926–6935.
105. **Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas BK, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N et al.** Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. Genes and Development **1997**11 167–178.
106. **Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A & Hennighausen L** Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. Genes and Development **1997**.11 179–186.
107. **Bole-Feyssot C, Goffin V, Edery M, Binart N & Kelly PA** Prolactin and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. Endocrine Review**1998** 19 225–268.
108. **100 Brown RSE, Herbison AE, Grattan DR.** Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. J Neuroendocrinol. **2014**;26(12):898-908.
109. **Bachelot A, Binart N,.**Reproductive role of prolactin, 2007, Society for Reproduction and Fertility,1626-1741–7899
110. **101 Araujo-Lopes R, Crampton JR, Aquino NS, Miranda RM, Kokay IC, Reis AM, et al.** Prolactin regulates kisspeptin neurons in the arcuate nucleus to suppress LH secretion in female rats. Endocrinology. **2014**;155(3):1010-20.

111. **Vilar L, Freitas MC, Naves LA, Casulari LA, Azevedo M, Montenegro R, et al.** Diagnosis and management of hyperprolactinemia: results of a Brazilian multicenter study with 1234 patients. *J Endocrinol Invest.* **2008**;31(5):436-44.
112. **de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E.** Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003**;100(19):10972-6.
113. **Topaloglu AK, et al.** Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* **2012**;366(7):629–635.
114. **Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR.** Identification of prolactinsensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology.* **2011**;152(2):526-35.
115. **Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al.** Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* **2005**;25(49):11349-56.
116. **Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al.** A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology.* **2004**;145:4073-7.
117. **Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, et al.** Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005**;90(12):6609-15.
118. **Jayasena CN, Abbara A, Comninou AN, Nijher GMK, Christopoulos G, Narayanaswamy S, I, et al.** Kisspeptin-54 triggers egg maturation in women undergoing in vitro fertilization. *J Clin Invest.* **2014**;124(8):3667-77.
119. **Sonigo C, Bouilly J, Carre N, Tolle V, Caraty A, Tello J, et al.** Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration. *J Clin Invest.* **2012**;122(10):3791-5.
120. **Fink, G.** Neuroendocrine regulation of pituitary function: general principles. In: Conn, PM.;Freeman, ME., editors. *Neuroendocrinology in physiology and medicine.* Humana Press; Totowa:**2000.** p. 107-134.
121. **Herbison AE, Skinner DC, Robinson JE, King IS.** Androgen receptor-immunoreactive cells in rat hypothalamus: distribution and co-localization patterns with gonadotropin-releasing hormone, somatostatin and tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology.* **1996**; 63:120–131. [PubMed:9053776]
122. **Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H.** Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci.* **2010**;30:3124–3132. [PubMed: 20181609]
123. **Guerriero KA, Keen KL, Terasawa E.** Developmental increase in kisspeptin-54 release in vivo is independent of the pubertal increase in estradiol in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Endocrinology.* **2012**; 153(4):1887–1897. [PubMed: 22315444]
124. **Navarro VM, Tena-Sempere M.** Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol.* **2011**; 8(1):40–53. [PubMed: 21912400]
125. **Navarro VM.** New insights into the control of pulsatile GnRH release: the role of Kiss1/neurokinin B neurons. *Front Endocrinol (Lausanne).* **2012**; 3:48. [PubMed: 22649420]

- 126. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE.** Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol.* **2006**; 498:712–726. [PubMed: 16917850]
- 127. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE.** Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience.* **2010**; 166:680–697. [PubMed: 20038444]



## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adana’da doğdu. İlk okulu Solaklı İOO, orta okulu Sakıp Sabancı İOO ve lise eğitimini Abdulkadir Paksoy Lisesinde tamamladıktan sonra üniversite eğitimini Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. Yüksek lisans eğitimine Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ABD’ de başladı ve eğitimine burada devam etmektedir.

