

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI

PREPUBERTAL DIŞI KEÇİLERDE KİSSPEPTİN
UYGULAMASININ PUBERTAS VE FERTİLİTE ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

CEM AKSU
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakkı Bülent BECERİKLİSOY

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
..... proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2023

KABUL VE ONAY

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Cem AKSU tarafından hazırlanan “Prepubertal Dişi Keçilerde Kisspeptin Uygulamasının Pubertas ve Fertilite Üzerine Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/05/2023

		Aydın Adnan	
Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Hakkı Bülent BECERİKLİSOY	Menderes	
		Üniversitesi	
		Aydın Adnan	
Üye	: Prof. Dr. Bayazıt MUSAL	Menderes	
		Üniversitesi	
		Aydın Adnan	
Üye	: Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ	Menderes	
		Üniversitesi	
		Harran	
Üye	: Prof. Dr. Ömer KORKMAZ	Üniversitesi	
		Kırıkkale	
Üye	: Doç. Dr. İlknur PİR YAĞCI	Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ile tez çalışmam süresince bilgi ve birikimi ile bana yol gösteren, ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Hakkı Bülent BECERİKLİSOY 'a

Doktora eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve tecrübeleriyle bana destek olan, anlayışlarını hiçbir zaman eksik etmeyen Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN, Prof. Dr. Bayazıt MUSAL, Prof. Dr. Güneş ERDOĞAN ve Dr. Öğr. Üyesi Bilginer TUNA'ya,

Tez çalışmamın laboratuvar analizlerinin yapılmasındaki değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ' a

Tez çalışmamın istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Murat BOYACIOĞLU' na

Bu süreç içerisinde yine bilgi ve birikimlerini paylaşan yardımlarını esirgemeyen Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU, Prof. Dr. Özgecan Korkmaz AĞAOĞLU, Dr. Öğretim Üyesi Afşin KÖKER ve Dr. Öğretim Üyesi Kürşad YİĞİTARSLAN'a

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince dostluklarını ve yardımlarını esirgemeyen değerli zamanlarını ayıran Dr. Öğretim Üyesi Eyüp Hakan UÇAR ve Dr. Öğretim Üyesi Cevdet PEKER'e

Bugüne kadar bilgi, tecrübe kazanmamda ve gelişimimde katkısı bulunan tüm öğretmenlerime teşekkürü borç bilirim.

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, beni büyüten, inançla arkamda duran annem ve babama,

Dünyaya geldiği günden beri her zaman yanımda olan, yüzümü güldüren, gençlere öğretmenlik, yeğenlerime annelik ve bana kardeşlik gibi zorlu görevi yerine getiren kız kardeşim Gamze'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Dişi Keçilerde Üreme Fizyolojisi.....	2
2.1.1. Keçilerde Pubertas.....	2
2.1.2. Keçilerde Seksüel Siklus ve Hormonal Mekanizma.....	3
2.1.2.1. Keçilerde Ovulasyon ve Korpus luteum.....	4
2.1.2.2. Seksüel Siklusun Evreleri.....	5
2.1.2.2.1. Proöstrüs.....	6
2.1.2.2.2. Östrüs.....	7
2.1.2.2.3. Metöstrüs.....	7
2.1.2.2.4. Diöstrüs.....	7
2.1.2.2.5. Anöstrüs.....	8
2.2. Üremenin Denetlenmesi.....	8
2.3. Gebelik ve Tanı Yöntemleri.....	9
2.3.1. Keçilerde Gebelik Tanı Yöntemleri.....	9
2.3.1.1. Ultrasonografik Yöntemler.....	9
2.3.1.2. Diğer Yöntemler.....	10
2.4. Küçük Ruminantlarda Pubertası Etkileyen Faktörler.....	10
2.5. Pubertas ve Reprodüktif Performansta, Nutrisyonel ve Hormonal Faktörlerin Etkileşimi.....	11

2.6. Pubertas Üzerine Etkili Esansiyel Bir Peptid Olan Kisspeptin ve Etki Mekanizmaları.....	13
2.6.1. Kisspeptinler ve Anatomik Lokalizasyonları.....	13
2.6.2. Kisspeptinlerde İzofom ve Sekans Etkisi.....	17
2.6.3. Kisspeptin ile GnRH İlişkisi ve Pubertas.....	20
2.6.4. AVPV/POA ve ARC Kisspeptinlerinin Mevsime Bağlı Reprodüktif Mekanizma Üzerindeki Etkileri.....	23
2.6.5. Kisspeptinlerin Uygulanma Yolları, Uygulama Dozları, Uygulama Süreleri ve Etki Mekanizmaları.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	54
3.1. Gereç.....	54
3.1.1. Hayvan Materyali.....	54
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Biyolojik Ürünler.....	55
3.2. Yöntem.....	57
3.2.1. Çalışma Dizaynı.....	57
3.2.2. Kisspeptin Sulandırma İşlemi ve Doz Ayarlaması.....	61
3.2.3. Kan Serum Numunelerinde Progesteron Hormonu Ölçümü.....	62
3.2.3.1. Elisa Testinin Yapılışı.....	63
3.2.4. Ultrasonografik Gebelik Muayenesi	65
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	67
3.2.5.1. Progesteron Hormonunun Farklı Zamanlarda Gruplar Arası ve Grup İçerisindeki İstatistiksel Analizi.....	67
3.2.5.2. Gebe Hayvan Sayısının Gruplar Arası İstatistiksel Analizi.....	67
4. BULGULAR.....	68
4.1. Serum Progesteron Düzeyleri.....	68
4.2. Gruplardaki Gebelik Oranları.....	73
4.3. Doğumlar.....	75
4.4. Yavruların Doğum Ağırlığı.....	75
4.5. Tekiz ve İkiz Doğum.....	75
4.6. Yavruların Cinsiyeti.....	76
4.7. Yavruların Doğum Aralıkları.....	76
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	92

KAYNAKLAR.....	94
EKLER.....	109
Ek 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı (Aydın ADÜ-HADYЕК).....	109
BİLİMSEL ETİK BEYANI.....	110
ÖZ GEÇMİŞ.....	111

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	:	Yüzde
<	:	Küçüktür
≥	:	Büyük eşittir
ARC	:	Arkuatik Nükleus
AVP	:	Arjinin Vasopressin
AVPV	:	Anteroventral Periventriküler Alan
BS-MT	:	Supplemented Lick Blocks (Yalama Taşı) – Mineral Takviyesi
C6	:	Compoud 6
CIDR	:	Controlled İnternal Drug Release
CL	:	Corpus Luteum – Korpus Luteum
CON-SKO	:	Oat Hay – Kuru Ot (Yulaf)
CS-KY	:	Concentrate Feed – Konsantre Yem
CSF	:	Cerebro Spinal Fluid – Serebro Spinal Sıvı
Dk	:	Dakika
Dyn	:	Dinorfin
Dyn A	:	Dinorfin A
eKp	:	Equine Kisspeptin
E2	:	Östrodiol
ERα	:	Östrojen Reseptör Alfa
ESR1	:	Östrojen Reseptör Alfa
GABA	:	Gama Amino Bütirik Asit
GH	:	Growth Hormone – Büyüme Hormonu
GnIH	:	Gonadotropin İnhibe Edici Hormon
GnRH	:	Gonadotropin Salınım Hormon
GPR54	:	G protein-coupled Receptor – Kisspeptin Reseptörü
hKp10	:	Human Kisspeptin 10
HPG	:	Hipotalama Hipofizyal Gonadal
ICV	:	Intracerebroventricular-İntraserebroventriküler
İ.M	:	Intramusculer-İntramusküler
IP	:	İntraperitoneal-İntraperitonel

İ.V.	:	İntravenöz
Kg	:	Kilogram
Kp	:	Kisspeptin
Kp-10	:	Kisspeptin 10
KISS1	:	Kisspeptin Geni
KISS1R	:	Kisspeptin Reseptörü
KNDy	:	Kisspeptin-Nörokinin B- Dinorfin
LH	:	Lüteinleştirici Hormon
mKp	:	Murine (Fare) Kisspeptin
MeA	:	Amygdala Medial Nukleus
MUA	:	Multiple Unit Aktivitesi
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
ml	:	Mililitre
µmol	:	Mikromol
ng	:	Nanogram
NKB	:	Nörokinin B
NK3R	:	Nörokinin B Reseptörü
Nmol	:	Nanomole
NO	:	Nitrik Oksit
nNOS	:	Nöronal Nitrik Oksit Sentezi
oKp	:	Ovine (Koyun) Kisspeptin
OVX	:	Ovariectomize
PGF_{2α}	:	Prostaglandin F ₂ alfa
PMSG-eCG	:	Gebe Kısrak Serum Gonadotropini-Equine Koryonik Gonadotropini
POA	:	Preoptik Alan
pmol	:	Pikomol
P4	:	Progesteron
PRL	:	Prolactin - Prolaktin
rKp	:	Rat Kisspeptin-Fare Kisspeptin
S.C.	:	Subcutan - Deri Altı
SH	:	Standart Hata
SNPs	:	Single Nukleotid Polimorfizim

TRH	:	Thyrotropin Salınım Hormonu
v.a.	:	Vücut Ağırlığı
VIP	:	Vazoaktif İntestinal Peptid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Keçilerde östrüs siklusu boyunca meydana gelen değişik fizyolojik olayların şematik anlatımı: folikül gelişimi, seksüel siklus ve endokrin regülasyonu.....	6
Şekil 2.	Kiss1 gen ürünü olan human kisspeptinlerin başlıca yapısal özellikleri.....	14
Şekil 3.	Hipotalama Hipofizyal Gonadal Aks (HPG) tarafından reproduktif fonksiyonun regülasyonu.....	25
Şekil 4.	AVPV/POA kisspeptin nöronlarının, ARC kisspeptin nöronlarının ve GnRH nöronlarının çalışma mekanizması.....	26
Şekil 5.	Anöstrus ve üreme mevsiminde nörolojik ve endokrinolojik mekanizmalar.....	28
Şekil 6.	Ovariectomize dişi koyunlardaki FSH ve LH (A ve B) salınımı üzerinde tek ve farklı dozlarda (100, 25, 6.2, ve 1.6 nmol/enjeksiyon) intravenöz yolla uygulanan hKp10 peptidinin etkileri. İlâveten farklı dozlardaki hKp10 peptidinin FSH ve LH salınımında yarattığı dinamik profiller.....	30
Şekil 7.	Fare Kp10 peptidinin 6.2 nmol dozda i.v. yolla tekrarlanan enjeksiyonlarının CSF içindeki GnRH (A) ve periferel dolaşımdaki LH (B) ve FSH (C) üzerine olan etkileri.....	32
Şekil 8.	Tek doz deri altı mKp10 ve devamlı i.v. yolla mKp10 infüzyonunun periferel dolaşımdaki LH ve FSH hormonları üzerine olan etkileri.....	33
Şekil 9.	İntravenöz yolla verilen 1 µg/kg (LH), 5 µg/kg (LH, GH, PRL) ve 10 µg/kg (LH) hKp10 enjeksiyonuna karşı dişi keçilerin plazma LH, GH ve PRL cevapları ile fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol dişi keçilerinin plazma LH, GH ve PRL cevapları.....	36
Şekil 10.	Dişi keçilere bir dizi tekrarlanan Kp10 (5 µg/kg) ve GnRH (5 µg/kg) enjeksiyonları sonucu plazma LH (Kp10 ve GnRH) ve FSH (Kp10 ve GnRH) hormon seviyeleri cevaplarının kendi aralarında ve fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol grubu hayvanlarla karşılaştırılması.....	38

- Şekil 11.** Fizyolojik tuzlu suda (5ml) çözündürülmüş Kp10 peptidinin prepubertal dişi kuzulara intravenöz enjeksiyonla 0, 0.5, 1, 2 mg dozlarda uygulandıktan sonra 180 dakika boyunca serum LH konsantrasyonlarındaki değişimler.....41
- Şekil 12.** Fizyolojik tuzlu suda (5ml) çözündürülmüş Kp10 peptidinin prepubertal dişi kuzulara intravenöz enjeksiyonla 0, 0.5, 1, 2 mg dozlarda uygulandıktan sonra ortalama LH konsantrasyonları bakımından Kp10 peptidi uygulanan prepubertal kuzular ile tuzlu su enjekte edilen kontrol grubu prepubertal kuzularının karşılaştırılması.....42
- Şekil 13.** Fizyolojik tuzlu suda (5ml) çözündürülmüş Kp10 peptidinin prepubertal dişi kuzulara 1mg dozda 1 saat aralıkla 3 kez tekrarlanan intravenöz enjeksiyonların 210 dakika boyunca serum LH konsantrasyonlarında meydana getirdiği değişimler.....44
- Şekil 14.** Ovariectomize ve Kp10 uygulanmış (500 µg/keçi) üç dişi keçiden 6 dk aralıklarla toplanan örnekler sonucu hipofizyal portal dolaşımdaki GnRH profilleri ve periferel dolaşımdaki LH profilleri.....46
- Şekil 15.** Çalışma boyunca yapılan uygulamalar, muayeneler ve çalışmanın amaçları.....60
- Şekil 16.** Kispetin uygulanan A ve B grupları ile fizyolojik tuzlu su verilen kontrol C grubundaki 5.5, 6, 6.5 aylık dişi oğlakların ortalama serum P4 düzeyleri (ng/ml).....68

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Araştırmada kullanılan aletler.....	56
Resim 2.	Çalışma gruplarında gerçekleştirilen uygulamalar.....	57
Resim 3.	Çalışmada kullanılan biyolojik ürün Tocris bioscience human kisspeptin 10 ve sulandırma.....	61
Resim 4.	Serum progesteron hormon ölçümü için keçi progesteron Elisa test kiti uygulaması (96'lık test kiti).....	64
Resim 5.	Transrektal yolla real-time B-mode ultrasonografik gebelik muayenesi ve plesantomların görüntüleri.....	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Çeşitli evcil hayvanlarda intravenöz Kp-10 peptidi uygulamasının LH hormonu uyarımında etkili olduğu doz miktarları.....	48
Tablo 2.	Memeli türlerine uygulanan farklı tiplerdeki ve dozlardaki kisspeptinlerin LH hormonu salınımı üzerine olan etkilerinin literatürlere göre dağılımı.....	49
Tablo 3.	Dişi koyunlara Kisspeptin 10 (Kp10) ve Kp10 analogları (FT080, Compound 17 ve C6) uygulandıktan sonra gonadotropin/steroid salınımı ve ovulasyon üzerinde gözlenen etkilerin özeti.....	52
Tablo 4.	Çalışma gruplarına intravenöz yolla yapılan uygulamalar.....	58
Tablo 5.	Vücut ağırlığına göre uygulanan kisspeptin doz hesaplaması.....	62
Tablo 6.	Progesteron hormon düzeylerinin gruplar arası istatistiki değerlendirmesi.....	69
Tablo 7.	5.5 aylık hayvanların serum progesteron hormonu ölçüm sonuçları.....	70
Tablo 8.	6 aylık hayvanların serum progesteron hormonu ölçüm sonuçları.....	71
Tablo 9.	6.5 aylık hayvanların serum progesteron hormonu ölçüm sonuçları.....	72
Tablo 10.	Gebe hayvan sayılarının gruplar arası istatistiki değerlendirmesi.....	73
Tablo 11.	10 aylık hayvanların trans-rektal yolla ultrasonografik gebelik muayenesi tanı sonuçları.....	74
Tablo 12.	Doğum Kayıtları.....	77

ÖZET

PREPUBERTAL DIŞI KEÇİLERDE KISSPEPTİN UYGULAMASININ PUBERTAS VE FERTİLİTE ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Aksu C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji (Veteriner) Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2023.

Amaç: Bu çalışmada prepubertal dönemdeki dişi keçilerde kisspeptinin pubertas ve fertilité üzerindeki etkinliği araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 1 Şubat – 15 Mart 2021 tarihleri aralığında doğan, ortalama 5 aylık ve 30 adet dişi Kıl keçisi kullanıldı. Prepubertal dişi oğlaklar (Grup A- n=10, Grup B- n=10, Grup C- n=10) rastgele üç gruba ayrıldı. Çalışmanın ilk periyodunda, Grup A’da 2µg/kg tek doz i.v. human kisspeptin 10 (hKp10), Grup B’de aynı şekilde 2µg/kg tek doz i.v. hKp10 ve Grup C’deki kontrol hayvanlarına plasebo olarak 1 ml i.v. fizyolojik tuzlu su uygulandı. Bu hayvanlar 5.5, 6 ve 6.5 aylık olduklarında her 15 günde bir tüm hayvanlardan kan serumunda progesteron hormonu seviyelerinin ölçümü amacıyla kan örnekleri toplandı. Çalışmanın son periyodunda pubertas ve fertilité üzerine kisspeptin ile birlikte erkek etkisini incelemek için 7 aylık olan tüm hayvanlara teke katımı yapıldı. Teke katımı yapıldıktan yaklaşık 8 saat sonra Grup A’da 2µg/kg ikinci tek doz i.v. hKp10, Grup B’de ilk periyoddakinden farklı olarak plasebo amaçlı 1 ml i.v. fizyolojik tuzlu su ve Grup C’de yine plasebo amaçlı 1 ml fizyolojik tuzlu su uygulandı. Bütün hayvanlar 10 aylık olduklarında transrektal yolla ultrasonografik gebelik muayeneleri yapıldı ve doğumlar kayıt altına alındı.

Bulgular: Sonuçlar incelendiğinde, gruplar arasında üç farklı zamanda analiz edilen kan progesteron düzeyleri ortalamaları ($X \pm SH$) arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmamıştır. Fakat çalışma grubu olan A ve B grubunda progesteron hormon düzeylerinde artış ve devamlılık gözlenirken C grubunda son ölçümde düşüş belirlenmiştir. Ayrıca 10 aylıkken yapılan gebelik muayenesinde elde edilen verilere göre çift doz hKp10 uygulanan hayvanlar, tek doz hKp10 uygulanan hayvanlar ve fizyolojik tuzlu su uygulanan hayvanlar ile

karşılaştırıldığında tekrarlanan çift doz kisspeptin uygulaması erkek etkisi ile birlikte daha fazla gebelik oranı oluşturmuştur.

Sonuç: Sonuç olarak hem tek doz kisspeptin uygulamasının hem de tekrarlanan çift doz kisspeptin uygulamasının serbest teke katımının yapıldığı sürüler için yüksek oranda pubertas üzerine etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada özellikle tekrarlanan dozda kisspeptin uygulamasının postpubertal aşamadaki dişi keçilerin fertilitesi üzerinde etkinlik oluşturabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Dişi Keçi, Dişi Oğlak, Fertilité, Kisspeptin, Kisspeptin 10, Ovulasyon, Pubertas.

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF KISSPEPTIN ADMINISTRATION ON PUBERTY AND FERTILITY IN PREPUBERTAL FEMALE GOATS

Aksu C. Aydin Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Department of Obstetrics and Gynecology (Veterinary), PhD Thesis, Aydin, 2023.

Objective: In this study, the effectiveness of kisspeptin on puberty and fertility in prepubertal female goats was investigated.

Material and Methods: Thirty female Hair goats were used that was born between February 1 and March 15, 2021, with an average age of 5 months old. Prepubertal female kids (Group A- n=10, Group B- n=10, Group C- n=10) were randomly divided into three groups. In the first period of the study, a single dose of 2µg/kg human kisspeptin 10 (hKp10) to the animals in group A, likewise a single dose of 2µg/kg hKp10 to the animals in group B and 1ml of physiological saline to the animals in group C was intravenously applied as placebo. Then, blood samples were collected from all animals for the measurement of progesterone hormone levels in blood serum every 15 days when at ages of 5.5, 6 and 6.5 months. In the last period of the study, to examine the male effect with kisspeptin on puberty and fertility, all animals at age of 7 months were mated with experienced billygoats. Approximately 8 hours later animals were mated with billygoats again and a second single dose of 2µg/kg hKp10 to the animals in Group A were applied intravenously. Animals in Group B and C were give a single dose of 1 ml physiological saline for placebo purposes. At the age of 10 months, transrectal ultrasonographic pregnancy examinations were performed and later records were taken at birth.

Results: It was observed no statistically significant difference was found between the groups in the mean blood progesterone levels ($X \pm SH$) analyzed at three different times. However, while an increase and continuity was observed in the levels of progesterone hormone in group A and B, a decrease was observed in the last measurement in group C. In addition, pregnancy rates were higher in Group A which administrated two dose of hKp10 with male effect, when compared to Groups B and C.

Conclusion: As a result, we can assume that both single-dose kisspeptin administration and repeated double-dose kisspeptin administration may be effective in initiating puberty in herds with free billygoat contribution. In this study, it was concluded that repeated doses of intravenous hKp 10 administration may have an effect on the fertility of post-pubertal female goats.

Keywords: Female Goat, Female Kid, Fertility, Kisspeptin, Kisspeptin 10, Ovulation, Puberty.

1. GİRİŞ

Evcil dişi hayvanlarda gametlerin üretildiği ve seksüel davranışların başladığı dönem pubertas olarak kabul edilir. Pubertas temel olarak gonadotropik aktivitenin artması, gonadların steroidogenezis ve gametogenezis yetenekleriyle uyum sağlanmasının sonucudur (Hafez, 1987).

Koyun ve keçi ırklarında optimal çevre şartlarında, pubertas yaşı genel olarak 5-12 aylık süreç içerisinde gerçekleşmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

Pubertasa erişme yaşını birçok faktör etkiler. Bunların başlıcaları; ırk, yaş, vücut ağırlığı, sütten kesme ağırlığı, bakım, besleme, genotip, doğum mevsimi, iklim, çevre şartları ve sosyal çevresel faktörlerdir (Kalkan ve Öcal, 2012).

Bu çalışmada küçük ruminant türlerinden keçilerde, pubertas üzerine etkili olduğu düşünülen bir kisspeptin molekülü izoformu olan human kisspeptin 10 (hKp-10) peptidinin etkisi çalışma gruplarına uygulanarak değerlendirilmiştir. Pubertas üzerine kisspeptin molekülü etkisinin küçük ruminant türlerinden çoğunlukla koyunlarda araştırıldığı keçilerde ise daha kısıtlı çalışmaların yapıldığı görülmüştür. Koyun ve keçilerin seksüel ve hormonal mekanizmalarının benzer olması nedeniyle kisspeptin molekülünün pubertas üzerindeki etkilerinin keçiler üzerinde çalışılması düşünülmüştür. Çalışma güncel bilgiler ışığında gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Keçilerde Üreme Fizyolojisi

2.1.1. Keçilerde Pubertas

Pubertas genel olarak dişilerin düzenli olarak ilk ovulasyon ve östrüs göstermeye başladığı zaman olarak tanımlanmaktadır (Foster, 1994). Pubertasa erişen hayvanlar ovulasyon yeteneği kazansa da bu hayvanların seksüel açıdan henüz olgunlaşmadığı vurgulanmaktadır. Optimal çevre şartlarında koyun ve keçi türlerinde pubertas yaşının genel olarak 5-12 aylık sürece yayıldığı belirtilmektedir. Pubertası ırk, yaş, canlı ağırlık ve mevsim olmak üzere dört ana faktör etkilemektedir. Keçilerde uygun yaş ve canlı ağırlığa ulaşıldıktan sonra mevsimin özellikle de bu tür hayvanlarda fotoperiyodun etkisi ile pubertasın başladığı belirtilmektedir. Ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede sonbaharda gün ışığının kısaldığı dönemde keçilerde üreme yani çiftleşme mevsiminin başladığı ortaya konmuştur (Canoğlu ve Sarıbay, 2012). Jainudeen ve diğerleri (2016) yayımladıkları literatürlerinde dişi keçilerde 5-7 aylık iken, dişi koyunlarda ise 6-9 aylık iken pubertasa ulaşıldığını belirtmektedir. Diğer yandan Kıvırcık ve Merinos koyun ırkları ile Ankara keçi ırkının ilk seksüel mevsimlerinde pubertasa ulaşamadıklarını ve sonuç olarak bu ırkların ilk östrüslerini 18-20 aylık iken gösterdiklerini bildirmektedir. Yani prepubertal dişi kuzu ve oğlakların pubertasa ulaşmalarının genetik, ırk, beslenme ve doğum zamanına bağlı değişkenlik gösterdiği ortaya konmaktadır. Yine pubertası erkek hayvan varlığı, yeterli veya yetersiz beslenme, uygun iklim koşulları, çevresel stres etkenlerinin varlığı veya yokluğu, genetik ve feromonlar gibi diğer faktörler de etkilemektedir (McDonald's, 2003). Delgadillo ve diğerleri (2007) mevsimsel poliöstrik türler olan koyun ve keçilerin pubertasa ulaşmalarında oğlak ve kuzuların doğum zamanı ile alakalı olduğunu ama doğum zamanı etkisinin her iki cinsiyet için aynı olmadığını belirtmektedir. Mayıs ve Ekim doğumlu dişi oğlaklardan Mayıs doğumlu olanların daha erken pubertasa ulaştığı buna karşın Mayıs ve Ekim doğumlu erkek oğlakların pubertasa aynı zamanda ulaştığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar doğum zamanının, dişi hayvanların pubertaslarına ulaşmasında daha etkin bir faktör olduğunu bildirmektedir.

2.1.2. Keçilerde Seksüel Siklus ve Hormonal Mekanizma

Seksüel siklus; hipotalamus, hipofiz, ovaryumlar ve uterus tarafından salgılanan hormonların koordineli etkileşimleri ile düzenlenmektedir. Küçük ruminantların (keçi ve koyun ırkları) mevsimsel poliöstrik hayvanlar olduğu ve üreme faaliyetlerini kontrol eden en önemli çevresel faktörün gün uzunluğu olduğu bildirilmektedir. Gün uzunluğunun kısalması ve retinadan alınan ışık sinyallerinin azalmasıyla epifizden salgılanan melatonin hormonu düzeyi artar ve sonuçta hipotalamustaki eminensiya mediyana uyarılarak buradaki nörosekretorik hücrelerden Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) salınımı meydana gelmektedir. Böylelikle mevsimsel üreme dönemi başlamaktadır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

Yine spontan olarak ovulasyon meydana getiren keçilerde üreme mevsiminin başlaması ve üreme mevsimi sürecinin uzunluğunun; hayvanların bulunduğu yarımküre, iklim, ırk, fizyolojik yapı, teke etkisi özellikle de fotoperiyod faktörlerine bağlı olduğu belirtilmektedir. Ilıman bölgelerde üreme mevsiminin sonbahar ve kış mevsimlerini kapsadığı, mevsimle birlikte keçinin ve hayvanların bulundukları bölge lokasyonu farklılığının da üreme döneminin başlaması ve uzunluğu açısından önemli farklılıklar ortaya koyduğu vurgulanmaktadır. Tropikal bölgelerde ise keçi türünün aralıksız üreme mevsimi süreci geçirdiği varsayılmaktadır. Yetersiz beslenme ise uzayan anöstrus ve anovulatör periyodlara aynı zamanda düşük fertilitateye neden olmaktadır (Fatet ve diğerleri, 2011).

Alaçam (2002) keçilerde seksüel siklusun genel hatları ile koyunlara benzediğini ve keçilerde östrüsün ortalama 28 (yirmi sekiz) saat (1-3 gün) sürdüğünü, östrüs belirtilerinin koyunlardan daha belirgin olduğunu ve teke katımının östrüsü belirlemede önem arz ettiğini belirtmektedir. Jainudeen ve diğerleri (2016) keçilerde östrüsün 24-48 saat sürdüğünü; ırk, yaş, mevsim, erkek varlığının östrüs süresini etkilediğini yine belirtmektedir. Koyunlarda yapağı ırklarının etçi ırklardan daha uzun östrüs periyoduna sahip olduğunu yine Ankara keçilerinin (22 saat östrüs süresi) sütçü ırkı keçilerden daha kısa bir östrüs periyoduna sahip olduğunu belirtmektedirler.

Keçilerde hipotalamo-hipofizer dolaşım aracılığıyla ön hipofize salınan GnRH hormonu burada gonadotropinlerin salınımını uyarmaktadır. Gonadotropik hormonların yani follikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) salınımı ile gonadların aktive olarak salınımını sağladığı seks steroidlerinin (östradiol) negatif-pozitif feedback mekanizmaları sonucu foliküler gelişimin tamamlandığı östrüs ve folikülün nihai olgunlaşması sonucu ovulasyonun meydana geldiği belirtilmektedir. Keçilerde ovulasyon preovulatör LH

dalgasından 20-24 saat sonra gerçekleşmektedir. Ovulasyondan sonra LH ve östradiol (E2) düzeyleri azalmaktadır. Çünkü ovulasyonu takiben ovaryum foliküllerindeki teka interna ve granuloza hücreleri lüteinize olarak korpus luteumu şekillendirmektedir ve gelişen bu korpus luteumdan salgılanan progesteron (P4) hormonu gonadotropin salınımı ile foliküler gelişimi baskılayarak muhtemel bir gebelik için uterusu hazır hale getirmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

2.1.2.1. Keçilerde Ovulasyon ve Korpus luteum

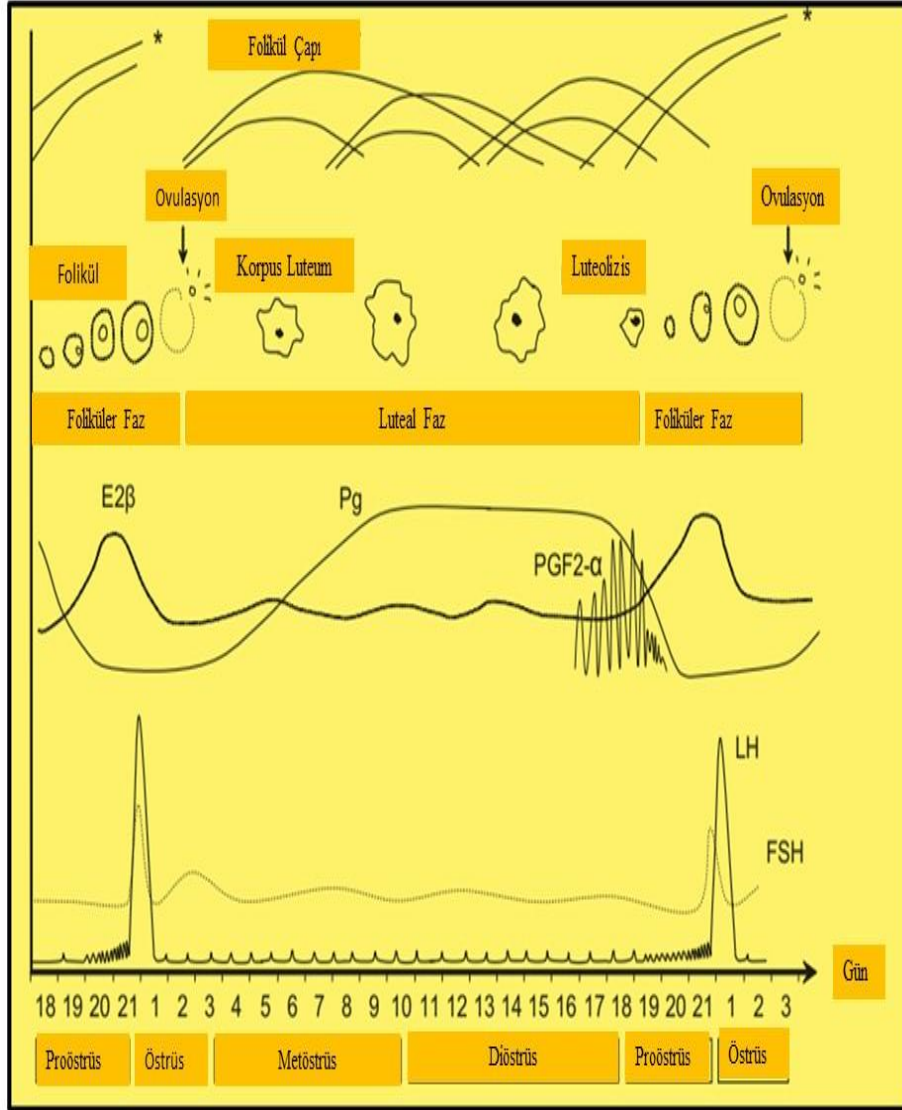
Keçilerde ovulasyon östrüsün başlamasından 30-36 saat sonra spontan olarak meydana gelmektedir (Alaçam, 2002). Yine Jainudeen ve diğerleri (2016) hem koyunlarda hem de keçilerde ovulasyonun spontan olarak oluştuğunu, koyunlarda ovulasyonun östrüsün başlangıcından 24-27 saat sonra yani östrüsün sonuna doğru normal olarak ve çoğu keçi türünde ise ovulasyonun östrüsün başlangıcından 24-36 saat sonra meydana geldiğini belirtmektedir. Jainudeen ve diğerleri (2016) ayrıca bazı keçi ırklarında ovulasyonun daha geç meydana geldiğini ortaya koyarken bunun muhtemel sebebinin de bu ırkların daha uzun östrüs siklusuna sahip olmasına dayandırmaktadır. Östrüsün başlamasından 10 saat kadar sonra LH hormonu 80ng/ml düzeyine çıktığında ve LH salınım sıklığı 30-60 dakika olduğunda ovulasyon gerçekleşmektedir. Keçilerin her siklusunda ise 2-3 oosit ovule olabilmektedir. Ovulasyon oranı genellikle üreme mevsiminin erken dönemlerinde üreme mevsiminin geç dönemlerine göre daha yüksek olmaktadır. Ama aynı zamanda vücut ölçüleri, vücut ağırlığı, vücut kondüsyonu ve genotip de ovulasyon oranının artırılmasına katkı sağlamaktadır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012; Jainudeen ve diğerleri, 2016).

Korpus luteumun regresyonu ve progesteron baskısının ortadan kalkmasıyla östradiol düzeyi ortalama 10 pg/ml'den 20 pg/ml'ye yükselmektedir ve bu artış östrüs belirtilerini şekillendirmektedir. Bu şekilde östradiol düzeyinin artışı sonucu olumlu başa tepkiyle GnRH ve FSH salgısı uyarılmaktadır. Östrüsten 24 saat önce FSH etkisiyle ovaryumlarda bir veya daha fazla foliküller geliştiği bu hızlı gelişimle beraber artan östradiolün granuloza hücrelerinden salgılanan inhibin etkisi ile FSH hormonunu baskıladığı ve preovulatör LH salgısına neden olduğu bilinmektedir. Siklusun lüteal fazında LH hormonunun 4-8 saatte salındığı ama bu salınımın ovulasyon için yetersiz olduğu, östrüsün başlamasından 10 saat kadar sonra LH düzeyi 80ng/ml'ye çıktığında ve salınım sıklığı 30-60 dakikaya düştüğünde ovulasyon meydana geldiği bildirilmektedir. Ovulasyonu takiben granuloza ve teka hücreleri

lütinize olarak korpus luteumu şekillendirmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012). Korpus luteumun salgıladığı progesteron hormonu anöstrus ve erken östrus sırasında düşük seviyelerde iken ovulasyondan sonra hızla artarak siklusun ortalarında 6-10 ng/ml en yüksek seviyesine ulaşmaktadır (Alaçam, 2002). Fatet ve diğerleri (2011) ovulasyon ile seksüel siklusun lüteal fazının başladığını ve östrüsün başlangıcından yaklaşık 5 gün sonra ovule olan folikül hücrelerinin lüteal hücrelere dönüştüğünü böylelikle CL formunun oluştuğunu belirtmektedir. Daha sonrasında korpus luteumdan 16 gün boyunca progesteron hormonu salınımının ($>1\text{ng/ml}$) devam ederek ve konsantrasyonunun artarak etkisini gösterdiği ortaya konmaktadır.

2.1.2.2. Seksüel Siklusun Evreleri

Keçilerde seksüel siklusun ortalama 21 gün sürdüğü ve bu sürenin ırk, yaş, üreme mevsiminin dönemi, bakım, besleme, çevre ısısı, teke ile bir arada bulunma gibi faktörlere bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (Fatet ve diğerleri, 2011; Canoğlu ve Sarıbay, 2012; Jainudeen ve diğerleri, 2016). Canoğlu ve Sarıbay (2012) keçilerde üreme mevsiminin başlangıcında, koyunlardaki gibi sakin kızgınlığa rastlanılmazken, korpus luteumun prematüre regresyonu ya da anovulasyon nedeniyle kısa sikluslar görülebildiğini vurgulamaktadır. Fatet ve diğerleri (2011) östrus siklusunu, ovaryumlar ve genital kanaldaki morfolojik ve fizyolojik bütün değişimlere bağlı olarak östrüs ekspresyonuna, ovulasyona, genital yolu çiftleşmeye, fertilizasyona ve embriyo implantasyonuna hazırlayan bir reproduktif aktivite olarak tanımlamaktadır. Östrüs siklusu uzunluğunu ise ardışık iki östrüs ekspresyonu veya ardışık iki ovulasyon aralığı olarak tanımlamaktadır. Yine östrüs siklusu boyunca ovaryumların bir dizi morfolojik (foliküler rekrutman ve büyüme), biyokimyasal (folikül olgunlaşması) ve fizyolojik (hormonal regülasyon) değişimlere maruz kaldığı ve bunun ovulasyonla sonuçlandığı anlatılmaktadır. Gonadlardaki bu siklik değişimleri seksüel siklus olarak tanımlamaktadırlar ve seksüel siklusu klasik olarak foliküler ve lüteal faz olmak üzere ikiye ayrıldığını belirtmektedirler (Şekil 1). Seksüel sikluslar proöstrüs, östrüs, metöstrüs, diöstrüs ve çiftleşme mevsimi dışındaki anöstrüs evrelerinden oluşmaktadır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).



Şekil 1. Keçilerde östrüs siklusu boyunca meydana gelen değişik fizyolojik olayların şematik anlatımı: folikül gelişimi, seksüel siklus ve endokrin regülasyonu. *Ovulatuvar foliküller* (Fatet ve diğerleri, 2011).

2.1.2.2.1. Proöstrüs

Bu dönemde hızlı bir foliküler gelişim, korpus luteumun regresyonu, östrojen düzeyinde artış ve progesteron düzeyinde azalma görülmektedir. Proöstrüs döneminde keçiler tekelere yaklaşır fakat aşımaya izin vermezler (Canoğlu ve Sarıbay, 2012). Seksüel siklusun bu evresinin ortalama iki gün sürdüğü bildirilmektedir (Özmen ve diğerleri 2021).

2.1.2.2.2. Östrüs

Aşımın kabul edildiği ve ovulasyonun meydana geldiği dönemdir. Östrüs dönemini süresinin hayvanın yaşına, ırkına, ortamda tekenin bulunmasına ve mevsime bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Ortalama 36 (24-48) saat sürdüğü diğer yandan üreme mevsiminin başında ve pubertasa yeni ulaşan dişilerde östrüs süresinin 3-6 saat kadar kısa sürebileceği bildirilmektedir. Ortamda tekenin bulunması ya da hayvan östrüsün başında çiftleştiğinde de östrüs süresinin kısalabileceği ayrıca belirtilmektedir. Pubertasa yeni ulaşan dişilerde ve mevsimin ilk östrüsünü gösteren yetişkin dişilerde kızgınlığın daha sakın geçtiğine dikkat çekilmektedir. Diğer yandan keçilerde östrüs döneminde görülen fizyolojik değişikliklerin koyunlara göre daha belirgin olduğu da belirtilmektedir. Östrüs belirtileri olarak; meleme, kuyruğu hızlı ve aşırı sallama, teke etrafında toplanma, tekenin önünde durma, iştah ve süt veriminde azalma, sık ürinasyon, diğer keçilerin genital bölgelerini koklama ve nadiren diğer keçileri aşma davranışları gözlenebilmektedir. Dış belirtilerin yanı sıra vajina mukozası nemli ve hiperemik, serviks açık ve kiremit rengindedir. Östrüsün sonuna doğru ise çara beyazlaşır peynirimsi görünüm alarak koyulaşır, serviks solgundur ve açıklığı azalmaktadır. Keçilerde kızgınlık tespiti arama tekeleriyle on iki saat aralıklarla günde iki kez, sabah erken ve akşam geç saatlerde yapılmaktadır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

2.1.2.2.3. Metöstrüs

Hayvanın çiftleşmeyi reddetmesi ile başlayan, bir ya da daha fazla aktif korpus luteum oluşuncaya kadar geçen dönemdir. Yani korpus luteumun şekillenme evresi olarak kabul edilmektedir. Genellikle 2-3 gün sürmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

2.1.2.2.4. Diöstrüs

Bu evre siklusun 3-4. günlerinde başlamaktadır. Korpus luteumun tam olarak geliştiği, etkin olduğu ve siklusun en uzun dönemidir. Yaklaşık 14-15 gün sürmektedir. Progesteron konsantrasyonu diöstrüs süresince 4-8 ng/ml düzeyindedir ve siklusun ortalarında en yüksek düzeye ulaşmaktadır (Alaçam, 2002; Canoğlu ve Sarıbay, 2012). Progesteron hormonu, olası bir gebelik ihtimaline karşı embriyonun uterusu tutunmasını ve beslenmesini sağlamak için genital organlardaki kontraksiyonları azaltarak uterus bezlerinin sekresyonunu başlatmaktadır.

Eğer gebelik şekillenmemişse siklusun 16-17. günlerinde uterustan salgılanmaya başlayan prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) hormonu korpus luteumun regresyonuna dolayısıyla da progesteron hormonunun düşmesine neden olmaktadır. Progesteron hormonunun düşmesi sonucu hipotalamus ve hipofiz üzerindeki baskılayıcı etkinin ortadan kalkarak GnRH salınımını ve yeni bir siklus başlamaktadır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

2.1.2.2.5. Anöstrüs

Seksüel dinlenme dönemi olup günlerin uzamaya başladığı kış sonundan yaz ortalarına kadar sürebilmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

2.2. Üremenin Denetlenmesi

Koyun ve keçilerde üremenin denetlenmesi uygulamaları, yüksek verimli hayvanların genetik özelliklerinin korunması, döl veriminin artırılması ve hayvan materyali ile yetiştirme olanaklarından en iyi şekilde faydalanmak amacıyla yapılmaktadır. Üremenin kontrolü ile mevsimsel poliöstrik hayvanlarda mevsimsel anöstrüste de gebelik elde edilebileceği gibi kuzu ve oğlaklarda daha erken yaşta cinsel olgunluğa erişileceği ve döl verimi alınacağı bildirilmektedir. Üremeyi denetlemek için; teke katımı, ışık/karanlık süresinin ayarlanması, çevre ısının düzenlenmesi, metabolik durum ve reproduksiyon arasındaki etkileşim nedeniyle iyi bir beslenme adaptasyonu, laktasyonun sona erdirilmesi ve feromonlar gibi doğal yöntemler uygulanmaktadır. Medikal yöntemler olarak ise üreme mevsimine geçiş döneminde, üreme mevsiminde ve anöstrüs döneminde farklı uygulamalar yapılmaktadır. Hayvanların içinde bulunduğu dönemlere göre progestagenler, gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG), equine koryonik gonadotropini (eCG), $PGF_{2\alpha}$, GnRH ve melatonin hormonları kullanılarak medikal yöntemler uygulanmaktadır. Pubertasa erişme dönemindeki kuzularda üremenin kontrolüne ancak 7-10 aylıkken başlanabilmektedir ve bu hayvanlarda progesteron ve PMSG uygulamaları başarılı olmaktadır (Fatet ve diğerleri, 2011; Uçar ve Özyurtlu, 2019). Mevsimsel anöstrüsteki kilis çebiçlerinde yapılan bir araştırmada eCG hormonunun süngerin çıkarılmasından 48 saat önce uygulanmasının daha faydalı olabileceği belirtilmektedir (Özmen ve diğerleri, 2021)

2.3. Gebelik ve Tanı Yöntemleri

Gebelik süresince devamlı gelişim gösteren konseptus yapısının, fonksiyonlarının ve maternal ortamla kurduğu bağlantılar blastogenezis, embriyonal ve fetal dönem olmak üzere üç ayrı evrede incelenmektedir. Blastogenezis fertilizasyondan gebeliğin maternal kabulüne kadar geçen, embriyonal dönem blastogenezisin sonundan keçilerde yaklaşık 42. güne kadar olan evredir. Fetal dönem ise embriyonal dönemin sonundan doğuma kadar olan süreçtir. Küçük ruminantlarda gebelik tanısının modern yetiştiricilikte, kontrollü üremenin yapıldığı sürülerde ve suni tohumlama uygulamalarında büyük önem taşıdığı kabul görmektedir (Erdem ve Sarıbay, 2019). Her hayvan türünde fertilizasyondan doğuma kadar geçen gebelik süresinin genetik olarak belirlidir ve gebelik koyun ve keçilerde ortalama 150 gün sürmektedir (Jainudeen ve diğerleri, 2016; Erdem ve Sarıbay, 2019). Yine Jainudeen ve diğerleri (2016) gebelik süresinin ırka ve bireyselliğe bağlı olarak değişkenlik gösterebildiğini bildirmektedir. Aynı ırk içinde bireysel olarak hayvanlar arasındaki gebelik süresi uzunluğunun 13 güne kadar çıkabileceğini öne sürmektedir. Bunun yanında erkek yavru gebeliğinin dişiye göre daha uzun, bahar doğumlarının sonbahar doğumlarından daha uzun gebelik süresi oluşturduğunu ve tek yavrulu gebeliklerin ikiz gebeliklere göre daha uzun olduğunu bildirmektedir. Yine gebelik süresinin anaç hayvanın yaşı ile arttığını belirtmektedirler.

2.3.1. Keçilerde Gebelik Tanı Yöntemleri

Küçük ruminantlar sürü hayvanı olduğundan gebelik tanısı amacıyla kullanılacak yöntemin ucuz, basit, saha ortamında kolay uygulanabilir ve yüksek oranda doğru sonuç vermesi istenmektedir. Küçük ruminantlarda gebelik tanısı amacıyla uygulanabilen 20' den fazla yöntem olduğu bildirilmektedir. Bu yöntemler içerisinde real-time ultrasonografinin; fetüs, anne ve operatör üzerinde zararlı bir etkisinin olmaması, saha şartlarında kolaylıkla uygulanabilmesi ve çabuk sonuç alınması nedeniyle öne çıkan bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Erdem ve Sarıbay, 2019).

2.3.1.1. Ultrasonografik Yöntemler

Ultrasonografik gebelik tanı yöntemleri A- mode ultrasonografi, doppler ultrasonografi, real-time B-mode ultrasonografi ve ultrasonografik fetal pulzasyon dedektörünü

kapsamaktadır. Küçük ruminantlarda gebelik tanısında en ideal yöntem olan real-time B-mode ultrasonografi uygulanmaktadır. Keçilerde real-time B-mode ultrasonografi yöntemi ile gebeliğin 15-30. günleri arasında transabdominal yoldan % 56 doğrulukta tanı konulabilmektedir. Keçilerde transabdominal yoldan en erken 27. günde doğru tanı konulabilmekle birlikte hidrometra ve uterustaki küçük sıvı birikintilerinin yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceğinden, plasentomların ve embriyoların gözlenemediği 30. güne kadar bu yöntemin güvenilir olmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle transabdominal yolla gebelik tanısı için en ideal günlerin 40-75. günler arası olduğu, transrektal yoldan ise 25-30. günler arası olduğu, kalp atımının transrektal yöntemde >25. günlerde, transabdominal yöntemde >35. günlerde, plasentomların transabdominal yöntemde >40. günlerde kupa veya C şeklinde iç bükey olarak tespit edildiği bildirilmektedir (Erdem ve Sarıbay, 2019).

2.3.1.2. Diğer Yöntemler

- | | |
|---|--|
| - Radyografi | - Vajinal smear |
| - Fetal elektrokardiyogram | - Servikal mukusun vizkozitesi |
| - Rektal-abdominal palpasyon | - Serviko vajinal mukus arborizasyon testi |
| - Palpasyon | - Servikal mukus kaynatma testi |
| - Meme sekresyonu | - İdrar kreatin/kreatinin oranı |
| - Vücut ağırlığının artması | - Kan şekeri seviyesi |
| - Sakral Refleks | - İmmunolojik testler |
| - Arama koçları ve tekeleri | - Antikolostrum testi |
| - Vajinal biyopsi | - Endokrinolojik muayeneler |
| - Kaudal uterus arterinin genişlemesi | |
| - Laparotomi ve peritonoskopi (Erdem ve Sarıbay, 2019). | |

2.4. Küçük Ruminantlarda Pubertası Etkileyen Faktörler

Pubertas, fizyolojik, morfolojik ve davranışsal açıdan istenen reproduktif yeterliğe ulaşmaya kadar geçen aşamalı bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Küçük ruminantlarda pubertas başlangıcının cinsiyetler arasında farklılık gösterdiği belirtilmektedir. Bu farklılığın nedeni ise erken seksüel diferensiyasyonun steroid feedback sistemleri üzerindeki kontrolü ve böylece GnRH salınımındaki etkisi olarak ortaya koyulmaktadır. Pubertasın belirleyicisi olan

genetik faktörler, endojen sinyaller, enerji dengesi ve çevresel faktörler gibi dinamik etkileşimlerin pubertas başlangıç zamanından sorumlu olduğu belirtilmektedir. Pubertas zamanlaması, ilk yavrulama yaşıyla beraber sonraki reproduktif hayatı ve küçük ruminantlarda verimliliği etkilemektedir (Valasi ve diğerleri, 2012).

Pubertasa ulaşma yaşı ile beslenmenin yakın ilişkisi vardır. Çok iyi beslenen hayvanlar daha erken pubertasa ulaşırken yetersiz beslenenlerde pubertas gecikmektedir (Alaçam, 2002).

Pubertas yaşında, yetersiz beslenmeye bağlı enerji eksikliği protein eksikliğinden daha fazla etkilidir. Bununla birlikte aşırı beslenme de fertilité üzerinde olumsuz etki yapmaktadır. Dişi ve erkeklerin birbirinden erken ayrılmaları da pubertasın gecikmesine neden olabilmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

Gelişme oranını etkileyen çeşitli hastalıklar, beslenme ve besin alımını doğrudan etkileyen problemler de pubertasa ulaşmayı geciktiren diğer etkenlerdir (Arthur, 2008).

2.5. Pubertas ve Reprodüktif Performansta, Nutrisyonel ve Hormonal Faktörlerin Etkileşimi

Besin alımı reproduktif açıdan belirleyici bir faktör olarak kabul edilmektedir. Yetersiz beslenme, pubertasın gecikmesine ve post-pubertal hayvanlarda anöstrusa neden olarak reproduktif başarısızlığa yol açmaktadır. Besin yetersizliğinin, öncelikli olarak moleküllerin ve hormonların salınımında değişikliklere neden olduğu ve anabolik fonksiyon için direkt ya da indirekt olarak hipotalamusa ve beyin sapına iletildiği ileri sürülmektedir. Yetersiz beslenme, hem iştahta artışa hem de reproduktif performansta düşüşe neden olmaktadır. Eğer beslenme yeterliyse tam tersi bir durumun şekillenmektedir. Besin eksikliğinin temel sonuçlarından birisinin lüteinleştirici hormon konsantrasyonundaki ve pulsatil frekanslarındaki düşüş olduğu belirtilmiştir. Her bir LH pulsunun, hipofiziyal portal sistem içerisine salınmış GnRH pulslarının direkt bir yansıması olduğu bildirilmektedir. Düşük seviyede beslenme memelilerde LH pulsatil salınımının baskılanmasına ve gonadal aktivitenin durmasına sebep olmaktadır (Daniel ve diğerleri, 2013). Lüteinleştirici hormon puls frekansında meydana gelen azalma, yetersiz beslenmeyle meydana gelen daha düşük bir GnRH frekans salınımı ile ilişkilendirilmektedir (I'Anson ve diğerleri, 2000).

Başta glikoz gibi besinlerin varlığı, insülin ve leptin gibi hormonal maddeler, nöropeptid Y ve kortikotropin salıcı hormon gibi nöroendokrinolojik karşılıklı etkileşimlerle LH salınımı ve reproduktif performansı üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. Diğer önemli maddeler olarak yağ asitleri, ghrelin, agouti nükleotidleri (hayvanlarda siyah pigment dağılımını kontrol eden gen dizilimi), melanin-konsantre hormon, oreksin, melanosit uyarıcı hormon, kisspeptin, nörokinin, dinorfin ve gonadotropin inhibe edici hormon beslenme ve üreme fonksiyonlarında rol almaktadır (Daniel ve diğerleri, 2013).

Jing ve diğerleri (2017) prepubertal dönemdeki Tibet dişi kuzularında yaptıkları çalışmada konsantre yem (KY), mineral takviyesi (MT) ve sadece kuru ot (yulaf) (SKO) ile beslemenin kisspeptin (Kp) sistemi ve reproduktif mekanizma üzerindeki etkisini araştırdıklarını belirtmektedir. Günlük ortalama ağırlık artışının konsantre yem verilen grupta mineral verilen gruptan daha fazla olduğunu ve konsantre ve mineral takviyeli iki grubun da yalnızca kuru otlarla beslenen gruptan daha fazla olduğunu bildirmektedirler. Yine aynı paternlerin KY>MT >SKO şeklinde ovaryum folikül sayısında da gözlemlendiği belirtilmektedir. Serum konsantrasyonları açısından GnRH, FSH, LH, östradiol ve progesteron hormonlarının KY ve MT gruplarında SKO grubuna göre çok daha fazla olduğu bildirilmektedir. Kış mevsiminde uygulanan bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile konsantre yem ve iz element takviyelerinin Kiss1/GPR54 sistemini daha fazla aktive ettiğini belirtmektedirler. Uygulama sonucu prepubertal dişi kuzularda Kiss1/GPR54 sisteminin, hipotalamo hipofizyal gonadal (HPG) aksının uyarıldığı ve foliküler gelişimin artırıldığı vurgulanmaktadır.

Manfredi-Lozano ve diğerleri (2018) her ne kadar türlerin devamlılığı için esansiyel olsa da, reproduksiyonun vücudun metabolik durumuna göre uyum sağlayan ve enerji gerektiren bir fonksiyon olduğunu bildirmektedir. Reprodüktif olgunlaşma ve fonksiyonların enerji açığının meydana geldiği koşullarda baskılanabileceği bunun yanında aynı zamanda persistant aşırı enerji alınması durumlarında da (örneğin morbid obezite) reproduksiyonda bozukluklar oluşabileceğini belirtmektedir. Pubertas bozukluklarının ve infertilitenin değişik formlarını ortaya koyan patofizyolojik ilişkide bu metabolik reproduktif bütünleşmeyi çok sayıda merkezi ve periferik düzenleyicilerin birliktaki etkisiyle yerine getirildiğini vurgulamaktadırlar. Nutrisyonel/enerji durumu ve gonadal fonksiyonlar arasındaki uyumu sağlayan bu etkilerin HPG aksını değişik düzeylerde etkilediğini düşünmektedirler. Negatif enerji dengesi ve aşırı enerji fazlalığının Kp sistemi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olduğunu ve bunun reproduktif sistemde farklılaşmaya pubertas bozukluklarına ve infertiliteye neden olduğunu bildirmektedir.

Foliküler gelişimin nutrisyonel takviyelerle geliştirildiği, kisspeptin geni (Kiss1)/kisspeptin reseptörü (Kiss1R) sisteminin besin alımı ile düzenlenebildiği ve reproduktif performansın iyileştirilebildiği belirtilmektedir (Decourt ve Beltramo, 2018).

2.6. Pubertas Üzerine Etkili Esansiyel Bir Peptid Olan Kisspeptin ve Etki Mekanizmaları

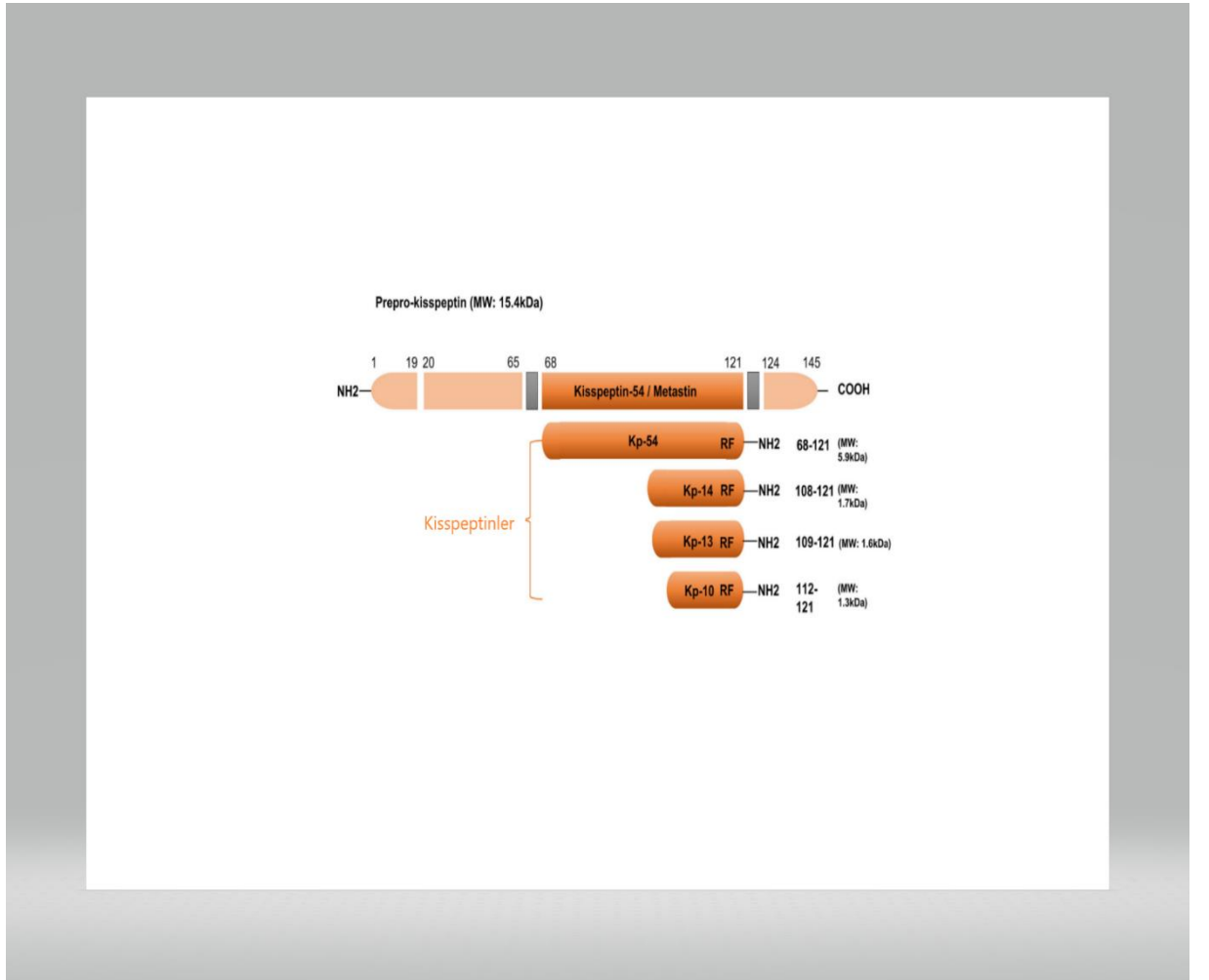
2.6.1. Kisspeptinler ve Anatomik Lokalizasyonları

Kisspeptinler, Kiss-1 olarak adlandırılan gen tarafından transkribe edilen bir öncül proteinden türemektedir ve farklı aminoasit uzunluklarındaki peptidler olarak bilinmektedirler. GPR54 reseptörü, memeli beyinde yaygın olarak bulunan galanin reseptörleri ile %40-45 benzerlik taşıdığı ve G proteini bağlantılı reseptörler (GPCR) ailesinin bir üyesi olduğu belirtilmektedir. GPR54 reseptörünün özellikle plasenta, hipofiz, pankreas ve medulla spinaliste yüksek oranlarda eksprese edildiğinin görülmesinden dolayı endokrin fonksiyonları olabileceği düşünülmüştür (Kafa ve Eyigör, 2011; Hu ve diğerleri, 2018). Kiss1 ve Kiss1 reseptör genlerinin serebellum (beyincik), serebral korteks (beyin zarı), beyin sapı, gonadlar, gastrointestinal sistem, karaciğer ve hatta vasküler sistem olmak üzere hemen hemen tüm vücutta ekspresyonu yapılmaktadır (Clarke ve Dhillon, 2016).

Kiss1 gen ürünü olan prekürsör Kp145 yani 145 aminoasitlik arjinin, fenialanin dizeleri içeren bu peptidin ilk proteolitik parçalanması ile Kp54 elde edilmiştir. Kisspeptin 54 üzerine yapılan ilave proteolizisler sonucu daha az molekül ağırlığına sahip ve aminoasit uzunlukları 10, 13, ve 14 olan peptidler elde edilmiştir. Kisspeptinler, kisspeptin reseptörlerine bağlanmayı sağlayan dekapeptid C terminallerine sahiptir (Clarke ve Dhillon, 2016). Günümüzde, bir metastaz baskılayıcı gen olarak bilinen KISS-1 geninin kodladığı ve C terminallerinde ortak RF-amid (Arg-Phe-NH₂) dizileri taşıyan 54, 14, 13 ve 10 aminoasitlik bir dizi proteinin, GPR54 reseptörüne bağlanarak agonist etki gösterdikleri bilinmektedir (Şekil 2). Prekürsörlerini kodlayan genin keşfedildiği şehire ait ünlü bir çikolata markasına (Hershey Kisses) itafen kisspeptin adını alan bu peptidler (kisspeptin 54, 14, 13 ve 10), üremeden enerji metabolizmasına kadar geniş bir yelpazede fonksiyon gösteren RF amid peptidleri ailesinin üyeleri olarak tanımlanmaktadır. Kisspeptinler, C terminallerinde 10 aminoasitlik aktif ve kisspeptin-10 olarak adlandırılan bir aminoasit dizisini ortak olarak taşımaktadır. GPR54

reseptörü tanımlaması yerine artık KISS1R teriminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu proteinlerin öncülerini kodlayan Kiss-1 geni ilk olarak insan malign melanoma hücre kültürlerinde “tümör metastaz baskılayıcı” bir gen olarak 1996 yılında izole edilip duyurulurken, kisspeptin peptidlerinden en fazla aminoasit dizisine sahip olan kisspeptin-54, insan melanom ve meme kanseri hücre kültürlerinde hücre çoğalmasını önleme özelliklerinin bilinmesinden ötürü metastatin olarak adlandırılmıştır (Meza-Herrera ve diğerleri, 2010; Kafa ve Eyigör, 2011; Hu ve diğerleri, 2018).

KISS-1 geni (1q32) tarafından üretilen 145 aminoasitlik bir öncül proteinden türeyen ve GPR54 üzerinden etkilerini gösteren peptidler kisspeptin nöropeptid ailesini oluşturmaktadır (Kafa ve Eyigör, 2011).



Şekil 2. Kiss1 gen ürünü olan human kisspeptinlerin başlıca yapısal özellikleri. Prekürsör (Kisspeptin 145) olan prepro-kisspeptinden klevaj ile farklı kisspeptinler üretilmektedir. Prepro-kisspeptin 145 aminoasit içermektedir. 19 aminoasit sinyal dizisi ve merkezde 54 aminoasit karboksi terminal parçasından oluşan Kisspeptin 54 (metastatin) yer almaktadır. Metastatinin klevajıyla daha düşük molekül ağırlığına sahip Kisspeptin-14 (Kp14), Kp13 ve Kp10 elde edilmektedir. Tüm kisspeptinler RF amid içermektedir ve kisspeptin reseptörlerine bağlanarak aktive olabilmektedir (Hu ve diğerleri, 2018).

Farklı memeli türlerinde kisspeptin nöronlarının beyin bölgelerindeki dağılımları ve diğer nöropeptid, hormon ve mediatörler ile olan kolokalizasyonları üzerindeki çalışmalar halen devam etmektedir (Kafa ve Eyigör, 2011).

Kisspeptin reseptör (KISS1R) gen ekspresyonunun beyin, hipofiz bezi, plesanta, pankreas dokularında yapıldığı ve daha sonrasında beyin üzerinde odaklanan araştırmalarda hipotalamustaki KISS1R gen ekspresyonunun varlığı ortaya konmuştur (Navarro ve diğerleri, 2004; Beltramo ve diğerleri, 2020).

Çoğunlukla kemiricilerde yapılmış kisspeptin nöron popülasyonu lokalizasyonları çalışmalarına bakıldığında Gottsch ve diğerleri (2004) ile Smith ve diğerleri (2006)' ne göre kemiricilerin hipotalamusundaki kisspeptin sinir uzantıları arkuat çekirdek (ARC), anteroventral periventriküler çekirdek (AVPV) ve periventriküler çekirdek (PeN) bölgelerinde yoğunlaşmaktadır ve kisspeptinleri sentezleyen bu sinir popülasyonları başlıca GnRH nöronlarını hedeflemektedir. Clarkson ve diğerleri (2009) kemiricilerde kisspeptin sinir uzantılarının lateral septumun ventral bölümünden, hipotalamusun periventriküler bölgelerinde ve retrokiazmatik yolların ventraline kadar aşırı miktarda ve küçük bir kısım kisspeptin sinir uzantılarının da stria terminalisin bed nükleusu, subfornikal organ, medial amigdala (MeA), paraventriküler hipotalamus, periaquaduktal gri cevher ve locus ceruleusta yoğunlaştıklarını bildirmektedir. Kafa ve Eyigör (2011) kisspeptin nöronlarının sıçan beyinlerindeki normal dağılımlarını incelemiş ve anteroventral periventriküler çekirdekte, preoptik periventriküler ve arkuat çekirdeklerde kisspeptin immunoreaktivitesi olan hücre topluluklarını tanımlamıştır. Sıçanlarda hipotalamik AVPV ve anterior arkuat çekirdek bölgelerinde diğer hipotalamik bölgelere göre daha az kisspeptin immunoreaktif hücre gövdesi gözlemlerken, mediyal arkuat çekirdekte orta düzeyde kisspeptin nöron hücre gövdeleri gözlemlenmiştir. En fazla akson yoğunluğunun ise rostral alanda olduğunu bildirmektedirler. Fare beyninde, kisspeptin nöronları hipotalamik yerleşimlidir, yoğun bir periventriküler devamlılık gösterecek şekilde 3. ventrikülün rostral kısmında, arkuat çekirdekte ve daha az yoğunluktaki dağılık hücre grupları halinde dorsomedial hipotalamik çekirdek ve posterior hipotalamusta bulunmaktadır.

Koyunlarda yapılan çalışmalara bakıldığında Franceschini ve diğerleri (2006) kisspeptin nöronlarının ARC kaudalinde, dorsomedial hipotalamik çekirdekte ve medial preoptik alanda (POA) yoğunlaştıklarını bildirmektedir. Estrada ve diğerleri (2006) ile Hassaneen ve diğerleri, (2016)'ne göre keçi, koyun, inek gibi ruminantlarda ve primatlarda kisspeptin nöronları anterior hipotalamusun POA bölgesinde ve mediobazal hipotalamustaki ARC bölgesinde olmak üzere başlıca iki hipotalamik bölgede lokalize olmaktadır.

Birinci kisspeptin populasyonun ARC'de lokalize olduğu çalışmlarla ortaya konmuştur. Gottsch ve diğlerleri (2004), Graives ve diğlerleri (2007) rodentlerde; Shahab ve diğlerleri (2005) primatlarda; Smith ve diğlerleri (2007) koyunlarda; Matsuyama ve diğlerleri (2011) gonadları sağlam ve kastrasyon yapılmış erkek keçilerde yaptıkları çalışma ile Okhura ve diğlerleri (2009b) yine kastrasyon yapılmış erkek shiba keçilerindeki lokalizasyonları belirtmektedir. Smith ve diğlerleri (2007) ve Matsuyama ve diğlerleri (2011) koyunlarda ve keçilerde ikinci kisspeptin nöron populasyonu lokalizasyon yerinin ise POA bölgesi olduğunu bildirmektedir.

Başlıca iki nöron popülasyon bölgesinden birincisi olan ARC bölgesindeki kisspeptinler ve birlikte ekspresyonu yapılan nörokinin B (NKB) ve dinorfin (Dy) bütünüyle kisspeptin-nörokinin B-dinorfin (KNDy) nöronları olarak adlandırılmaktadır (Goodman ve diğlerleri, 2007; Lehman ve diğlerleri, 2010, Beltramo ve diğlerleri 2020). Nörokinin B'nin KNDy nöronlarından kisspeptin salınımı yapabileceği ve inhibe edici bir endojen opioid peptid olan dinorfinin ise kisspeptin salınımını sonlandırabileceği bildirilmektedir. Diğer bir deyişle KNDy nöronları GnRH puls üretiminde intrinsik bir kaynak olarak etki oluşturmaktadır ve bu nöron grubundaki nörokinin B uyarıcı bir sinyal gibi, dinorfin A inhibe edici bir sinyal gibi ve kisspeptinin ise üretici bir sinyal gibi GnRH salınımında rol alarak GnRH salınımını yönetmektedir. KNDy nöronları, nörokinin B reseptör (NK3R) ve dinorfin ile aynı kökten gelen K-opioid reseptör ekspresyonu yapmaktadır (Navarro ve diğlerleri, 2009; Wakabayashi ve diğlerleri, 2010; Goodman ve diğlerleri, 2014; Uenoyama ve diğlerleri, 2021)).

Fare beyinde Kiss1 mRNA ekspresyonunun incelendiği çalışmada Gottsch ve diğlerleri (2004) çoğu Kiss1 ekspresyonunun AVPV, PeN ve ARC bölgelerinde yapıldığını az miktarda ise üçüncü bir nöron popülasyon alanı olarak kabul edilen MeA bölgesinde kisspeptin hücre gövdeleri bulduklarını bildirmektedir. Kim ve diğlerleri (2011) MeA kisspeptin popülasyonunu korku, stres, anksiyete ve stres gibi bir dizi fizyolojik ve davranışsal süreçler ile ilişkilendirilmektedir. Bunun yanında kisspeptinler ve reseptörlerinin pubertasa ulaşmada ve fertilite üzerindeki rolü nedeniyle MeA kisspeptin populasyonlarının seksüel davranışlar, gonadotropin salınımı, ovulasyon ve pubertal gelişim gibi bazı reproduktif fonksiyonların modülasyonunda önemli etkiler oluşturabileceğini düşünmektedirler. Sakamoto ve diğlerleri (2013) küçük ruminantlarda mevsimsel anöstrus döneminde uygulanan teke/koç katımında salgılanan koku maddeleri yani feromonlar aracılığıyla seksüel siklusun yeniden başlatıldığını, keçilerde teke katımı yani feromon etkisi ile GnRH salınımı üzerindeki hızlandırıcı etkinin esasında ARC bölgesindeki kisspeptin ve nörokinin B nöronları sayesinde meydana getirildiğini öne sürmektedir. Bu nöron grubunun feromonların merkez hedefi olabileceği

hipotezini savunmaktadırlar. Sakamoto ve diğerleri (2013) keçilerde yaptıkları çalışma sonucunda erkek feromon sinyallerinin MeA (beynin emosyonel hislere bağlı işlemleriyle alakalı primer bölgesi) kisspeptin nöronları yoluyla ARC kisspeptin nöronlarına nakledildiğini ve dışarıdan gelen sinyallerin NKB sinyal-yönetim mekanizması ile GnRH puls üretimini aktive ettiğini ileri sürmüştür. Beltramo ve diğerleri (2020) KNDy nöron grubunu bir GnRH puls üreticisi olarak kabul etmektedir. Fakat bu araştırmacılar evcil hayvanlarda MeA bölgesinde lokalize olan kisspeptin nöronlarının feromonları düzenleme ve yönlendirme işlevinin henüz keşfedilmediğini hatta aslında evcil türlerde böyle bir populasyon varlığının olmadığını bildirmektedir.

Atlarda kisspeptin nöronları arkuat çekirdekte, preoptik alanlarda uzantı sergilerken daha yoğun olarak ise periventriküler alanda ve median eminense bulunmaktadır. Atlarda kisspeptin ve GnRH nöronlarına ait sinir uzantıları arasındaki ilişkinin median eminense daha fazla olduğu bildirilmektedir. Primatlarda ise ARC kisspeptin nöronları tanımlanmıştır ve AVPV ile periventriküler yerleşimli kisspeptin nöronları hakkında fazla bilgi elde edilemediğinden bu alanlarda kisspeptin nöron popülasyonu olabileceği düşünülmektedir (Kafa ve Eyigör, 2011).

2.6.2. Kisspeptinlerde İzofom ve Sekans Etkisi

Kisspeptin prekürsörlerinin (Kp145) işlenmesi (klevaj) ile bazı farklı endojenöz Kp izoformları ortaya çıkmaktadır. İzofomların en kısa aktif sekanslı olanı 10 aminoasitli, prekürsörün C terminal bölümü ile uyuşan Kp10 izofomudur. Bu C terminal bölümündeki Kp10 sekanslı izofom memelilerde çok iyi korunmakta ve yalnızca birkaç varyantı tanımlanmaktadır. Diğer bölümde kalan sekans ise daha az korunmaktadır. Kisspeptin 10 izofomundan başka üç izofom daha tanımlanmaktadır. Bunlardan iki tanesi kısa sekanslı (zincirli) olanlar Kp13 ve Kp14 (13 ve 14 numaraları aminoasit zincir uzunluğunu belirtmektedir) izoformları ve diğeri ise uzun sekanslı olan türler arasında çeşitlilik gösteren (Kp54 insanlarda; Kp53 sığırlarda, koyunlarda ve keçilerde; Kp52 farelerde) izoformlardır (Beltramo ve diğerleri, 2020).

Sıçanlarda ve koyunlarda Kp16 ve Kp13 izoformlarının aslında en etkili kısa izoformlar olduğu ileri sürülmektedir (Caraty ve diğerleri, 2012). Kisspeptin 16 ve Kisspeptin 13 izoformları ile ilgili çalışma sonuçlarının değerlendirilmemesi ve diğer izoformlar ile yapılan çalışmalara odaklanılması nedeniyle Kp16 ve Kp13 izoformları etkinliğinin incelenmesi geri

planda kalmıştır. Kisspeptin sistemi hakkında en çok elde edilen bilgilerin Kp10 izoformu uygulanarak daha az derecede ise Kp54 izoformu uygulanarak kazanıldığı bildirilmektedir (Beltramo ve diğerleri, 2020).

Gutierrez-Pascual ve diğerleri (2009) kisspeptin 10 sekansında gözlenen küçük değişimlerin işlevsel sonuçları beraberinde getirdiğini fakat bu durumun sekansın yapısına dayanması nedeniyle önceden tahmin edilmesi zor bir durum olduğunu belirtmektedir. Bu araştırmacılara göre human ve ovine Kp10 (hKp10 ve oKp10) izoformları C terminallerinde farklılık göstermektedir. Yani hKp10 sekansının son aminoasiti fenil alanin, oKp10 sekansının son aminoasiti ise tirozindir. Bu yüzden aminoasit biyolojik aktivasyon için temel yapı iskeletin bir parçası yani farmakofor bölge olarak sayılmaktadır. Bu bölgedeki modifikasyonlar moleküllerin aktivitesini etkilemektedir (Gutierrez-Pascual, 2009). Caraty ve diğerleri (2007) hem hKp10 hem de oKp10 peptidlerinin koyunlara enjeksiyonu sonrası plazma LH ve FSH düzeylerinde bir artış olduğunu puls şiddetlerinde ve sürekliliğinde de benzerlik meydana geldiğini gözlemlemiştir. Hashizuma ve diğerleri (2010) yetişkin Japon dişi keçilerin luteal fazlarında gerçekleştirdikleri bir çalışmada ve Saito ve diğerleri (2012) prepubertal (3 aylık) Shiba erkek oğlaklarda yaptıkları çalışmada hKp10 peptidinin intravenöz (i.v.) enjeksiyonu sonucunda koyunlardakine benzer FSH ve LH düzeyleri elde etmiştir. Başka bir araştırmacı grubu tarafından Melez Hereford düvelerinde sığır Kp10 (yapısal olarak oKp10 peptidine benzerlik gösterir) ile hKp10 peptidlerinin etkileri karşılaştırılmıştır. Düvelerde yapılan araştırmanın sonuçlarına bakıldığında hKp10 peptidinin plazma LH konsantrasyonlarında sığır Kp10 peptidine göre daha belirgin bir etki yarattığı görülmüştür. İlaveten düvelere iki saatin üzerinde tekrarlayan hKp10 enjeksiyonlarının ovulasyonu tetiklediği ama aynı şekilde sığır Kp10 peptidinin böyle bir etki oluşturmadığı bildirilmektedir (Leonardi ve diğerleri, 2019).

Equin Kp10 (eKp10) peptidinin de oKp10 peptidine benzerlik gösterdiği ve karşılaştırıldığında tek bir aminoasit farkı (arjinin aminoasiti yerine valin aminositi) olduğu belirtilmektedir. Kalsiyum mobilizasyon testleri sonucu eKp10 peptidinin oKp10 ve hKp10 peptidlerine göre daha az potansiyele sahip olduğu görülmüştür. Human ve ovine Kp10 peptidlerinin benzer güçte etkiye sahip oldukları, equin Kp10 peptidinin bunlara göre on kez daha az etkili olduğu bildirilmektedir. Kısıraklarda kapsamlı olarak uygulanan eKp10 peptidinin, koyunlarda uygulanan oKp10 peptidinde olduğu gibi ovulasyon meydana getirmediği hatta östrustaki kısırakların normal seksüel sikluslarını dahi bozduğu gözlemlenmiştir. Yani kisspeptindeki tek bir amino asit modifikasyonu, kisspeptinlerin farklı

türlerin reseptörleri üzerindeki aktive edici kapasitesini değiştirmektedir (Beltramo ve diğerleri, 2020).

Kisspeptin sistem mekanizması ilk olarak kisspeptinlerin endojenöz enjeksiyonları ile keşfedilmiştir. Kisspeptinler içerisinde kolay sentezlenmesi ve yüksek etkisi nedeniyle en kapsamlı olarak Kp10 izoformu kullanılmaktadır. Kemiriciler, koyunlar, keçiler, inekler, domuzlar, kısraklar ve köpekler gibi bazı dişi türlerde tek doz Kp enjeksiyonu her ne kadar kısa süreli de olsa ani bir LH ve/veya FSH artışını tetiklemektedir. Mevsimsel anöstrüsteki dişi koyunlara 24 saat veya daha fazla süre ile intravenöz Kp10 uygulandığında hayvanların yaklaşık %75' inde ovulasyon meydana gelmektedir (Beltramo ve diğerleri, 2020). Redmond ve diğerleri (2011)'ne göre prepubertal dişi kuzulara 24 saat boyunca her saat uygulanan Kp10 peptidi LH artışını ve ovulasyonu başlatmaktadır. Bu sonuçlar kisspeptin sisteminin dişilerin reproduktif sikluslarını hedeflediğini göstermektedir. Diğer yandan Kp10 peptidinin kullanımındaki en büyük dezavantaj çabuk indirgenerek atılması yani kısa ömürlü etkiye sahip olmasıdır. Diğer taraftan Kp10 peptidinin uzatılan aktivasyonunun insanlarda ovulasyonu başlattığı beraberinde reproduktif patolojiler (hipotalamik amenore: cinsel yaşama girmiş kadının adet görmemesi) gibi problemlere neden olduğu bildirilmektedir (Beltramo ve diğerleri, 2020).

Bu problemin üstesinden gelmek için uzun aktivasyon sağlayan daha uzun formların kullanılması gerektiği önerilmektedir. Örneğin erkek sıçanlarda rKp10 ve hKp10 peptidlerinin yüksek dozlarının dahi karşılaştırılamayacağı, rKp52 peptidinin daha uzun süreli ve yüksek şiddetli bir LH artışı meydana getirdiği belirtilmektedir (Pheng ve diğerleri, 2009). Yine benzer başka bir çalışmada erkek farelere uygulanan hKp54 uzun izoform ile hKp10 kısa izoformun reproduktif hormonların salınımı üzerinde eşit etki göstermediği, kisspeptinlerin enjeksiyonundan 10 dakika ve 2 saat sonra yapılan plazma LH hormonu ölçümlerinde hKp54 peptidinin hKp10 peptidine göre daha yüksek şiddette ve çok daha uzun süreli bir LH hormonu artışı sağladığı gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre hKp54 peptidinin kan dolaşımındaki yarılanma ömrü yaklaşık 32 dakika, hKp10 peptidinin kan dolaşımındaki yarılanma ömrü ise yaklaşık 4 dakika olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar yarılanma ömründeki bu durumu kompanse etmek için her 10 dakikada 1 saat boyunca tekrarlanan hKp10 peptidi dozu uyguladıklarını ama buna rağmen tek doz hKp54 enjeksiyonu ile elde ettikleri yüksek ve devamlı LH hormonu konsantrasyonlarını hKp10 peptidinin tekrarlanan dozları ile elde edemediklerini bildirmektedir. Bu verilere göre hKp54 peptidinin kan beyin bariyerinin

ardındaki GnRH nöronlarına geçişte başarılı olduğu fakat hKp10 peptidinin bu yeteneğinin çok daha düşük olduğu düşünülmektedir (d'Anglemont de Tassigny ve diğerleri, 2017).

Ovulasyonun başlatılmasında Kp10 uygulamasının potansiyel olmasına rağmen saha şartlarında protokollerin uygulanması pratik olmadığından ve bunun üstesinden gelmek için farmakolojik özellikler açısından Kp10 analogları (compound 6) geliştirilmektedir (Tablo 3; Decourt ve Beltramo, 2018).

2.6.3. Kisspeptin ile GnRH İlişkisi ve Pubertas

Gonadotropin salgılatıcı hormon nöronları, reproduktif fonksiyonları aktive eden ve pubertasa ulaşmayı sağlayan çeşitli nöropeptid ve hormonal sinyallerin son hedef noktası olarak kabul edilmektedir (Prashar ve diğerleri, 2022).

Gonadotropin salgılatıcı hormonun aktivasyonu çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir. Bu faktörler nöronal etkileşimler kisspeptin, KNDy, nöronal nitrik oksit (nNOS), gonadotropin inhibe edici hormon (GnIH), vazoaaktif intestinal peptid (VIP), arjinin vasopressin (AVP); hücrelerel etkileşimler astrositler, tanisitler ve vasküler endotelial hücreler; protein-ligand etkileşimler leptin, ghrelin, adinopektin; nörotransmitterler (sinir taşıyıcısı) nitrik oksit, γ -aminobütirik asit (GABA), eksisatör amino asit, gonadal steroidler; peptid olmayan etkileşimler dopamin, serotonin, epinefrin, norepinefrin, histamin olarak sınıflandırılmıştır (Spergel, 2019). Dungan ve diğerleri (2006), Bellefontaine ve diğerleri (2011), Bedenbaugh ve diğerleri (2018)' ne göre POA (%79) kisspeptin nöronlarının büyük bir yüzdesi ve ARC (%98) kisspeptin nöronlarının büyük bir yüzdesi nNOS ile lokalize olmaktadır ve kisspeptinler nNOS nöronları ile yakın temas kurmaktadır. Kisspeptinlerin aksine GnRH'nın nNOS nöronları üzerine yakın bir teması belirlenmemiştir. Dolayısıyla GnRH salınımında kisspeptin ve nNOS etkileşiminin GnRH nöronları üzerinde esansiyel bir rol oynadığı ve prepubertal dişi kuzularda bu etkileşimin hem pubertal döneme geçişi sağladığı hem de fertilité açısından devamlılık oluşturduğu belirtilmektedir. Çeşitli araştırmacılara göre ruminant kisspeptin nöron popülasyonlarından biri olan hipotalamusun POA bölgesinden ve median eminens bölgesine kadar uzanan GnRH nöron gövdelerinden salınan GnRH hormonunun hipofizyal portal sisteme katıldığı ve GnRH etkisiyle hipofizin ön lobundan LH/FSH hormonları salınımı gerçekleştirdiği bildirilmektedir. Araştırmacılar gonadotropin salgılatıcı hormon nöronlarının rostral preoptik alanda dendron adı verilen akson ve dendritlerle median

eminense ulaştığını ve bu dendronların median eminens içerisinde GnRH 'nın salınımından sorumlu birçok kısa aksonlar olarak çoğalıp dallanarak portal kan damarları üzerine yerleştiğini ve GnRH'nın böylelikle dolaşıma salındığını belirtmektedir. Yani bu distal dendronlardaki sinaps inervasyonlarının ve dendronlara ait dallanan kısa aksonların yoğun (sık) olmasının büyük ihtimalle fertilité için gerekli GnRH salınımının kontrolünde etkili bir mekanizma sunduğunu düşünmektedirler (Herde ve diğerleri, 2013; Moore ve diğerleri, 2018; Prashar ve diğerleri, 2022).

Sıçan, maymun, koyun ve keçi gibi memelilerde reproduktif fonksiyonlar hipotalamik hipofizyal gonadal aks tarafından düzenlenmektedir. Hipotalamik GnRH nöronlarından salgılanan GnRH hormonunun hipofizyal portal dolaşıma karışmasıyla hipofizi uyaran GnRH pulsatil salınımı sonucu follikülogenezis, spermatogenezis ve steroidogenezis için esansiyel olan LH/FSH pulsaları ve GnRH dalgası sonucu LH dalgası meydana gelmektedir (Sarkar ve diğerleri, 1976; Neill ve diğerleri, 1977; Moenter ve diğerleri, 1991; 1992; Tanaka ve diğerleri, 1997; Navarro ve Tena-Sempere, 2011).

Kisspeptin molekülü keşfedilinceye kadar uzunca bir süre hipotalamuasta lokalize olan gonadotropin salgılatıcı hormon hipotalama hipofizyal gonadal aksı yöneten başlıca peptid kabul edilmiştir. Reproduktif nöroendokrinolojide ilk metastin olarak adlandırılan kisspeptin peptidinin keşfi dönüm noktası olmuştur. Kemiriciler, ruminantlar ve primatlar gibi çoğu memelilerde kisseptinlerin GnRH salınımını düzenlediği ve kisspeptin nöronlarının GnRH nöronlarında eksprese edilen bir kisspeptin reseptörü olan GPR54 yoluyla GnRH salınımını direkt uyardığı bildirilmektedir (Irwig ve diğerleri, 2004; Shahab ve diğerleri, 2005; Uenoyoma ve diğerleri, 2018; Matsuda ve diğerleri, 2019).

Kisspeptinlerin reproduktif fonksiyondaki rolünün yaşamın erken dönemlerinde başladığı ileri sürülmektedir. Pubertas, GnRH nöronlarının aktivitesine bağlı olarak juvenil dönemden erginliğe reproduktif gelişim açısından bir geçiş periyodu olarak tanımlanmaktadır. Gonadotropin salgılatıcı hormon nöronlarının ilk olarak uterusu aktive edildiği fakat juvenil dönem boyunca pasif halde kaldığı belirtilmektedir. Zamanından önce GnRH nöron reaktivasyonu farelerde ve insanlarda erken pubertasa neden olmaktadır. Bu GnRH nöron aktivasyonu kontrolünün altında yatan mekanizma henüz bilinmezliğini korumaktadır. Ciddi bir sinyal tetikleyicisi gibi pubertasa ve temel bir regülatör olarak yetişkin dişilerin hipotalamo hipofizyal gonadal aksına etki eden potansiyel bir GnRH nöron akitivatörü nöropeptid kisspeptinlerin, pubertasa ulaşmadan çok önce gelişmekte olan beyin nöronları tarafından üretildiği düşünülmektedir. Farelerde kisspeptin ve kisspeptin reseptörlerinin embriyonik

dönemin 13. gününden beri var olduğu bildirilmektedir. Arkuat çekirdekteki kisspeptin üreten nöronların uterustaki GnRH nöronları etkileşim içinde olduğu uzun süredir bildirilmektedir. Araştırmacılar çalışmaları sonucunda kisspeptin nöronlarının GnRH nöronlarının kaynağı olduğunu ve GnRH nöronlarının ARC kisspeptin nöronlarına bağlatısının beyindeki uzantısal pozisyonuna bağlı olmadığını gördüklerini ve ARC kisspeptin ile GnRH nöronları arasındaki nöronal devrelerin tam olarak kabul edildiğini ve doğumdan önce işlevsel olduğunu belirtmektedir. Yani embriyodan beri başlayan bu fonksiyonun pubertasa geçiş sırasında da kisspeptinlerin bir kapı görevi gördüğünü ortaya koymaktadır (Kumar ve diğerleri, 2014).

Teles ve diğerleri (2008)'ne göre insanlarda, KISS1R mutasyonları sonucu fonksiyonlarını kaybettiğinde veya kazandığında sırasıyla infertilite ve vaktinden evvel pubertas meydana gelmektedir. Colledge (2009)' a göre gen yapısı değiştirilmiş transgenik farelerde yapılan çalışmalarında KISS1'in pubertasa ulaşılmasında ve fertilite üzerindeki etkinliği ortaya konmuştur. Meza-Herrera ve diğerleri (2010) ile Kafa ve Eyigör (2011) GPR54 reseptörlerinin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların insanlar ve farelerde pubertal gelişim ve üreme aktivitesinde kayıp ile beraber hipogonadotropik hipogonadizme sebep olması nedeniyle GPR54 sisteminin pubertas ve GnRH aktivitesi için önemli olduğunu ve Kiss1R mRNA düzeylerinin prepubertal dönemde, Kiss1 mRNA düzeylerinin ise pubertal dönem ile arttığını bildirmektedir.

Kemiricileri, primatları ve ruminantları içeren memelilerde GnRH/gonadotropin salınımını düzenleyen ve bunun sonucu pubertası başlatan mekanizmada anahtar rolü oynayan yapıların arkuat çekirdekteki KNDY nöronları olduğu, bu nöronların bir GnRH puls üreticisi gibi işlev gördüğü ve pubertas üzerinde etkin bir rol oynadığı düşünülmektedir. Pubertal başlangıcın ayarlanmasında, kisspeptinlerin biyosentezi ve salınımı kemiricilerde ve koyunlarda seks steroidlerine bağımlı primatlarda ise seks steroidlerinden bağımsız bir mekanizma ile güçlü bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır (Uenoyama ve diğerleri, 2019).

Prepubertal dönem boyunca GnRH sekresyonundaki pulsatil artış, trans-sinaptik iletimdeki koordineli değişimler ve nöron-gliya hücreleri arasındaki etkileşimler ile meydana gelmektedir. GnRH sekresyonuyla pubertal aktivasyon oluşturulurken, nöron ve gliya hücrelerinden gelen eksitator sinyallerin arttığı ve trans-sinaptik inhibisyonun düştüğü gözlemlenmektedir. Bu süreçte, nörotransmisyon ve nöromodulasyon süreçlerini ortaya koyan nöronal sistemler glutamat ve kisspeptin olmakla beraber en önemli inhibitörük sinyaller ise GABAerjik ve opioterjik nöronlardır (Meza-Herrera ve diğerleri, 2010). Kisspeptinlerin, GABAerjik ve glutamaterjik afferentleri (getiren sinir) içeren trans-sinaptik yollarla olduğu

kadar direkt olarak ta GnRH nöronlarını etkilediği bildirilmektedir (Pielecka-Fortuna ve diğerleri, 2008; Pielecka-Fortuna ve Moenter, 2010).

Navarro ve diğerleri (2004) dişi sıçanlarda kisspeptin uygulamasının pubertası başlattığını, Foster ve Jackson (2006) kisspeptin uygulaması sonrası ovulasyon meydana geldiğini dişi kuzularda pubertal geçişte kısa luteal fazlara yaygın olarak maruz kalınmasına rağmen, bu durumu sıklıkla başka bir ovulasyon ve normal uzunlukta bir östrus siklusunun izlediğini, Ezzat Ahmed ve diğerleri (2009) prepubertal dişi ve erkek buzağılara kisspeptin uygulamasının her iki cinsiyette de FSH ve LH salınımını uyardığını, Kafa ve Eyigör (2011) sıçanlarda, farelerde, koyunlarda, primatlarda kisspeptin uygulamasının gonadotropin düzeylerini artırdığını, Redmond ve diğerleri (2011) prepubertal dişi kuzularda kisspeptin enjeksiyonlarının LH salınımını uyardığı ve ovulasyon meydana getirebildiğini belirtmektedir.

Normal bir pubertas başlatılması için kisspeptin sisteminin uygun bir şekilde aktive edilmesi gerekmektedir. Kisspeptin gen ekspresyonundaki artış ile pubertal gelişim meydana gelmektedir (Navarro ve diğerleri, 2004a; Shahab ve diğerleri, 2005; Clarkson ve diğerleri, 2009).

2.6.4. AVPV/POA ve ARC Kisspeptinlerinin Mevsime Bağlı Reprodüktif Mekanizma Üzerindeki Etkileri

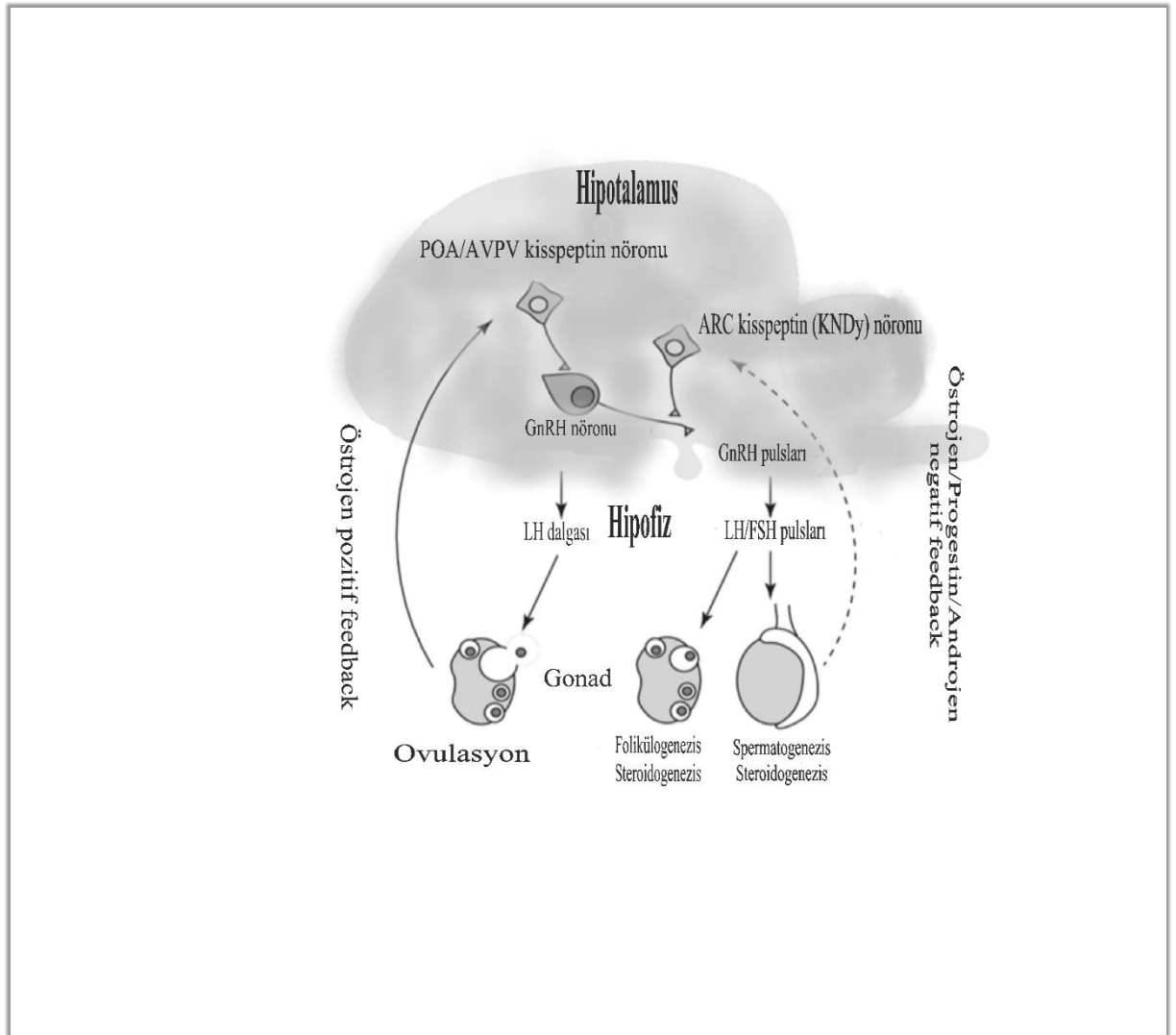
Merkezi LH dalgası üretimi açısından en çok çalışılan ruminant türü olarak koyunlar kullanılmıştır. Koyunların POA bölgesindeki kisspeptin nöronları, ARC bölgesindeki kisspeptin nöronları kadar östradiol reseptör alfa (ER α) ekspresyonu yapmaktadır. Arkuat çekirdek ve preoptik alandaki her iki kisspeptin nöron popülasyonları östrojen reseptör alfa, progesteron reseptörleri ve androjen reseptörleri taşımaktadır. Dolayısıyla kisspeptin nöronları seks steroidleri feedback mekanizmalarının hedefi sayılmaktadır. Bazı araştırmacılar LH dalgalanmasından hemen önce POA ve ARC bölgelerindeki kisspeptin nöron sayılarında ve aktivasyonunda artış rapor etmiş olup her iki bölgedeki kisspeptin nöron popülasyonunun da GnRH/LH dalga üretimi yaptığını ileri sürmektedir. Diğer bir araştırmacı ise farklı olarak dişi koyunlarda POA bölgesindeki kisspeptin nöronlarının yarısından fazlasının c-FOS üretimi ile beraber belirleyici bir nöronal aktivasyon oluşturduğunu, ARC bölgesinde ise spontan olarak LH dalgalanması boyunca az miktarda kisspeptin nöronları ile beraber c-FOS üretiminin gözlemlendiğini bildirmektedir. Keçilerin de koyunlar kadar iyi bir model olduğu kabul

edilmektedir. Ovariectomize (OVX) edilmiş dişi keçilere yüksek seviyelerde östrojen verilmesi sonucu POA bölgesinde aktive olan Kiss1 pozitif nöronlarında artış olduğu fakat bu artışın ARC bölgesindeki Kiss1 nöronlarında görülmediği bildirilmektedir. Yani ARC bölgesindeki kisspeptin nöronlarından daha ziyade POA bölgesindeki kisspeptin nöronlarının LH dalgalarını başlattığı ileri sürülmektedir. Hatta koyun ve keçiler mekanizma olarak birbirine benzeyen türler olmasına rağmen, GnRH/LH dalgalarının üretimindeki mekanizmalarında bazı farklılıkların olabileceği öne sürülmektedir (Urias-Castro ve diğerleri, 2019; Matsuda ve diğerleri, 2019).

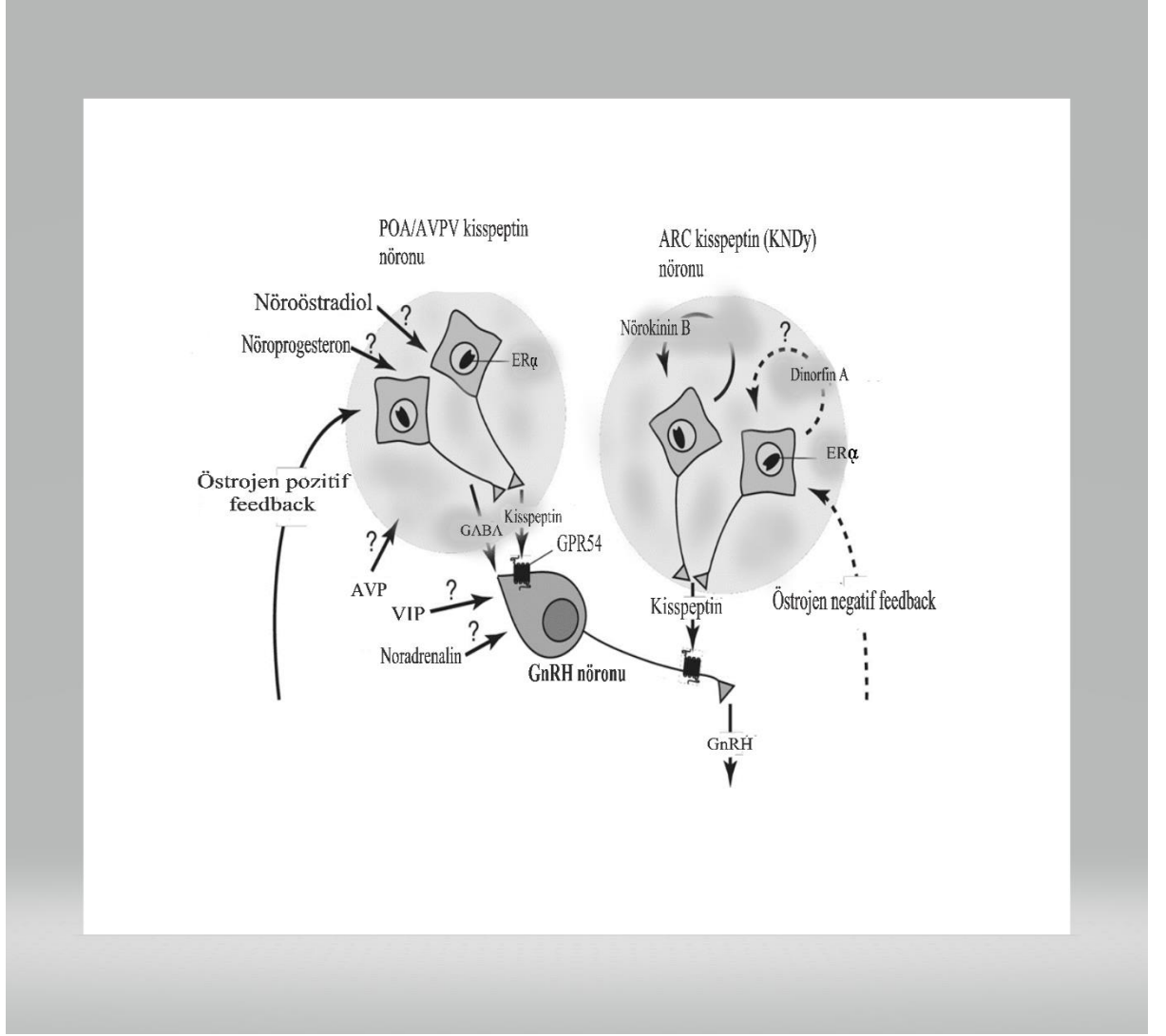
Ovariectomize dişi koyunlara i.v. Kp-10 uygulandığında, serebrospinal sıvıda dolaşımdaki LH konsantrasyonlarında ve GnRH konsantrasyonlarında artış sağladığı görülmüştür. Koyunlara bir Kp antagonisti olan peptid 234 merkezi olarak uygulandığında LH puls frekansını engelleyerek LH puls şiddetini düşürdüğü ve ortalama LH konsantrasyonlarını azalttığı belirtilmiştir. Yine ovariectomize koyunlarda Kiss1R antagonisti olan p-271'in merkezi olarak uygulanmasının da LH pulsatil konsantrasyonlarını engellendiği bildirilmiştir. Kisspeptin üretiminin düzenlenmesinde östrodiol gibi steroidlerin de etkili olmasıyla beraber ARC bölgesindeki Kp pozitif hücre sayısının sağlam hayvanlarla karşılaştırıldığında ovariectomize koyunlarda arttığı gözlemlenmiştir ve tam aksi bir durum ise POA bölgesindeki Kp nöron sayısının arttığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, östrojen ve progesteron uygulanmış ovariectomize koyunlarda ARC bölgesindeki Kp pozitif hücre sayısının azaldığı görülmüştür. Ayrıca, ARC bölgesindeki Kp pozitif hücrelerinin büyük çoğunluğu progesteron reseptörleriyle birlikte oluşmaktadır (An ve diğerleri, 2013; Daniel ve diğerleri, 2015).

Kemiricilerde AVPV ile ARC (KNDy nöronları), keçilerde, koyunlarda ve primatlarda ise POA ile ARC bölgelerindeki kisspeptin nöronlarının GnRH dalga ve puls üretiminde büyük olasılıkla çok daha fazla etkili olduğu öne sürülmektedir (Smith ve diğerleri, 2005; Adachi ve diğerleri, 2007; Hoffman ve diğerleri, 2011; Daniel ve diğerleri, 2015; Matsuda ve diğerleri, 2015). Uenoyoma ve diğerleri (2016), Matsuda ve diğerleri (2019) (Şekil 3 ve Şekil 4) ile Beltramo ve diğerleri (2020) hipotalamusun anterior (ön) yani rostral preoptik alandaki kisspeptin nöron popülasyonunun östrojen pozitif feedback mekanizması ile direk hedef olarak GnRH/LH sekresyonunun dalga modunu kontrol ederek ovulasyonu düzenlediğini, hipotalamusun kaudal bölümündeki arkuat çekirdekte bulunan KNDy kisspeptin nöron popülasyonunun ise östrojen negatif feedback mekanizması ile GnRH/gonadotropin puls üretimini kontrol ederek foliküler gelişimi düzenlediğini ve bu modelin çoğu memeli türünde bu şekilde kabul görüldüğünü belirtmektedir. Oshimo ve diğerleri (2021)'ne göre de

hipotalamik POA bölgesinde kolokalize olan kisspeptin nöronları GnRH dalgası ve bunu izleyen LH dalgası ile dişi memelilerde ovulasyonun meydana gelmesini sağlamaktadır ve elde ettikleri bulgulara göre preovulator östrojen seviyelerinin östrojen pozitif feedback etkisi ile preoptik alandaki kisspeptin nöronlarını aktive ederek GnRH/LH dalgalarını başlatmaktadır.



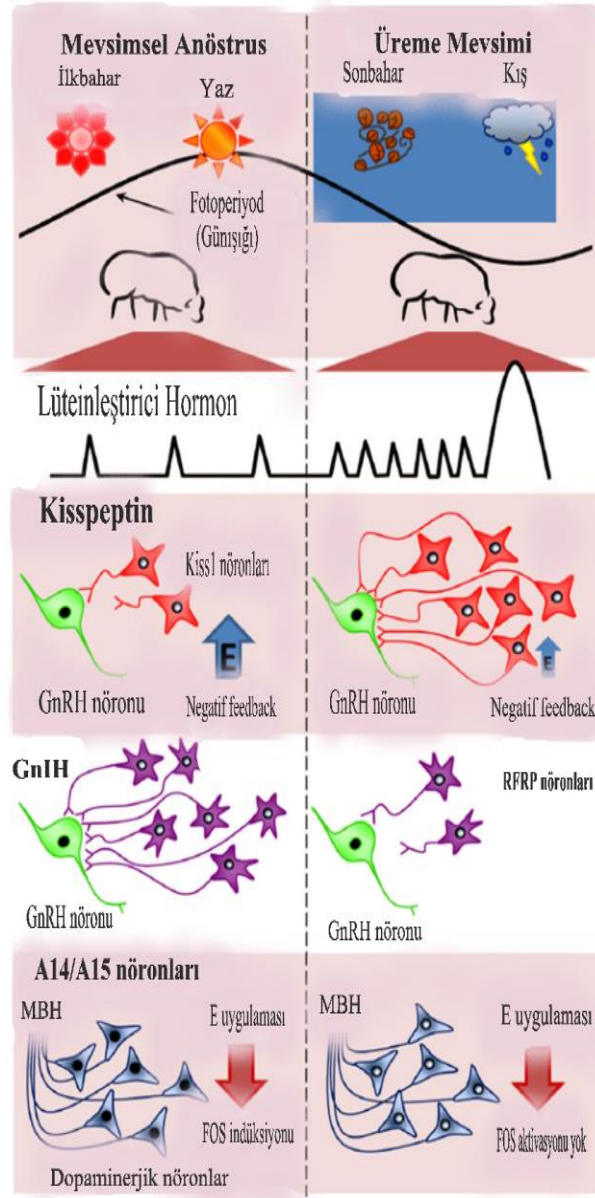
Şekil 3. Hipotalama Hipofizyal Gonadal Aks (HPG) tarafından reproduktif fonksiyonun regülasyonu (Matsuda ve diğerleri, 2019).



Şekil 4. AVPV/POA kisspeptin nöronlarının, ARC kisspeptin nöronlarının ve GnRH nöronlarının çalışma mekanizması (Matsuda ve diğerleri, 2019).

Mevsimsel değişim Kiss1 ekspresyonunu etkilemektedir. Kisspeptin hücrelerinin GnRH nöronlarına giriş derecesi üreme mevsimi döneminde mevsimsel anöstrüs döneminden daha fazla olmaktadır. GnRH nöronlarına gerçekleşen girişin ARC hücrelerindeki güçlenmeden kaynaklı olup olmadığı saptanmamasına rağmen, GnRH nöronlarına girişin büyük ihtimalle preoptik kisspeptin hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu yüzden üreme mevsiminde hem kisspeptin ekspresyon seviyesinin hem de GnRH nöronlarına kisspeptin girişinin daha yüksek olduğu ve yılın bu döneminde östrojenin kisspeptin üzerine olan negatif feedback etkilerinin daha düşük olduğu bildirilmektedir. Yani kisspeptin hücrelerinin, reproduksiyonun mevsime bağlı düzenlenmesinde esansiyel bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Smith ve diğerleri, 2008; Smith ve Clarke, 2010).

Kisspeptinler hem mevsimsel üremeyi hem de pubertal zamanlamayı etkilemektedir. Mevsimsel anöstrüsteki dişi koyunlarda asiklik durumun, kisspeptin fonksiyonunun azalmasıyla alakalı olduğu ve böyle hayvanlarda kisspeptin uygulanmasının ovulasyonu başlattığı belirtilmektedir. Ayrıca, ratlarda da kisspeptin uygulamasının pubertasın başlangıcını geliştirdiği ve bu yüzden mevsime bağlı üremede nöropeptid sistemin birincil olarak sorumlu olduğu bildirilmektedir. Mevsimsel anöstrüste uygulanan sürekli kisspeptin infüzyonu, GnRH/LH salınımı üzerinde üreme mevsimindeki östrus siklusunun foliküler fazıyla kıyaslanacak düzeylerde uyarı meydana getirmektedir. İnfüzyon sonucu, büyük ihtimalle ovaryumlarda östrojen üretiminin aktive olduğu sonrasında beyinde pozitif feedback mekanizmasını başlattığı ileri sürülmektedir. Yine mevsimsel anöstrüs döneminde kisspeptin uygulanan hayvanların östrojenin negatif feedback mekanizmasından etkilenmediği ve LH salınımının başlatılabildiği görülmüştür. Kisspeptin, pubertal döneme geçişte çok önemli bir faktördür ve reproduksiyon açısından mevsimsel geçişte benzer önem arz ettiği görülmektedir. Hem pubertas hem de üreme mevsimine geçiş GnRH/gonadotropin tepkisinin benzer paternlerini kapsamaktadır ve özellikle de artmış olan seks-steroid negatif feedback salınımıyla ilgili olarak benzerlik görülmektedir. Mevsimsel geçişin melatonin konsantrasyonlarıyla harekete geçirildiği, ama pubertal döneme geçişte bunun söz konusu olmadığı önemli bir farklılık olarak bildirilmektedir. Bir de melatonin konsantrasyonlarının mevsimsel üreme dönemi dışında pubertasın başlamasını engelleyerek pubertal gelişimi etkilediği belirtilmektedir (Şekil 5; Smith ve Clarke, 2010).



Şekil 5. Anöstrus ve üreme mevsiminde nörolojik ve endokrinolojik mekanizmalar (Smith ve Clarke, 2010).

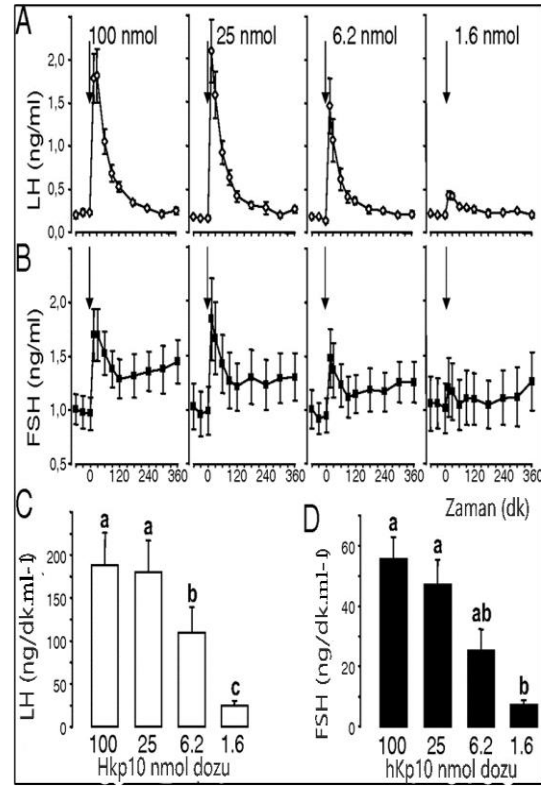
Koyunlarda seks steroidleri ve fotoperiyot düzenleyici olarak kombine etki göstermektedir. Ovariectomize ve östrojen implantı uygulanan (17 beta östradiol içeren derialtı 2 cm silastik kapsül) koyunlarda, üreme mevsimi ile karşılaştırıldığında mevsimsel anöstrüste mediyobazal hipotalamus ve preoptik alanda daha düşük Kp düzeyleri gözlenmiştir ve uzun gün (16:8 saat gündüz/karanlık) ışığından kısa gün (8:16 saat gündüz/karanlık) ışığına geçilirken POA ve ARC bölgelerinde Kp ekspresyonu sağlayan nöronlarda bir artış başladığı bildirilmektedir (Chalivoix ve diğerleri,2010; Urias-Castro ve diğerleri, 2019).

2.6.5. Kisspeptinlerin Uygulanma Yolları, Uygulama Dozları, Uygulama Süreleri ve Etki Mekanizmaları

Caraty ve diğerleri (2007) hKp10 peptidinin i.v. yolla farklı dozlarının (100, 25, 6.2, ve 1.6 nmol/enjeksiyon) yarattığı LH ve FSH cevaplarını değerlendirmiştir. Anöstrus döneminde olan OVX dişi koyunlara deri altı (s.c.) yolla SILASTIC implant (östrodiol implantı) uygulandıktan sonra hKp10 peptidinin farklı dozlarının etkin bir şekilde 15 dakika içinde LH salınımını uyarmıştır ve maksimum seviye aralığı enjeksiyon öncesine göre 2 ila 10 kat arasında değişmiştir. Ortaya çıkan ortalama LH cevabı şiddetine bakıldığında 1.6 nmol hKp10 dozu diğer üç doza göre belirgin oranda daha düşük LH cevabı oluşturmuştur. Ortaya çıkan puls salınımı daha kısa sürmüş ve enjeksiyon öncesi LH değerlerine dönüş çok daha hızlı gelişmiştir. Diğer üç yüksek dozda ise enjeksiyon öncesi değerlere dönüş daha geç olmuştur ve hKp10 peptidinin farklı dozları LH salınımı üzerinde belirgin farklı sonuçlar meydana getirmiştir (Caraty ve diğerleri, 2007).

Human kisspeptin 10 peptidinin FSH ve LH hormonları üzerindeki etkinliği farklılık göstermektedir. Human kisspeptin 10 peptidi uygulamasıyla plazma FSH düzeyinin LH düzeyine göre daha hızlı arttığı, FSH hormonunun oluşturduğu cevabın LH hormonundan daha düşük olduğu ve diğer yandan LH hormonu ile karşılaştırıldığında FSH hormonunun enjeksiyon sonrası elde edilen düzeylerinin geçen zamana bağlı daha uzun süre korunduğu bildirilmektedir. Peptidin uygulama dozunun artırılmasıyla LH hormonunda olduğu gibi FSH hormonunda da verilen cevabın arttığı belirtilmektedir (Şekil 6; Caraty ve diğerleri, 2007). Sıçanlarda in vivo olarak intraserebroventriküler (ICV) yolla kisspeptin uygulamalarında FSH cevabı oluşturmak için LH cevabı için uyguladıkları dozun yaklaşık 100 katı kadar dozda peptid uygulanmaktadır ve intravenöz yolla Kiss1 enjeksiyonu önemli derecede FSH salınımı

sağlamaktadır (Navarro ve diğerleri 2005). Caraty ve diğerleri (2007) LH/FSH hormon salınımında tür farklılığının, peptidi uygulama yolunun (intraserebroventriküler ve intravenöz) ve hayvanların fizyolojik yapısının yön veren faktörler olabileceğini ileri sürmektedir.

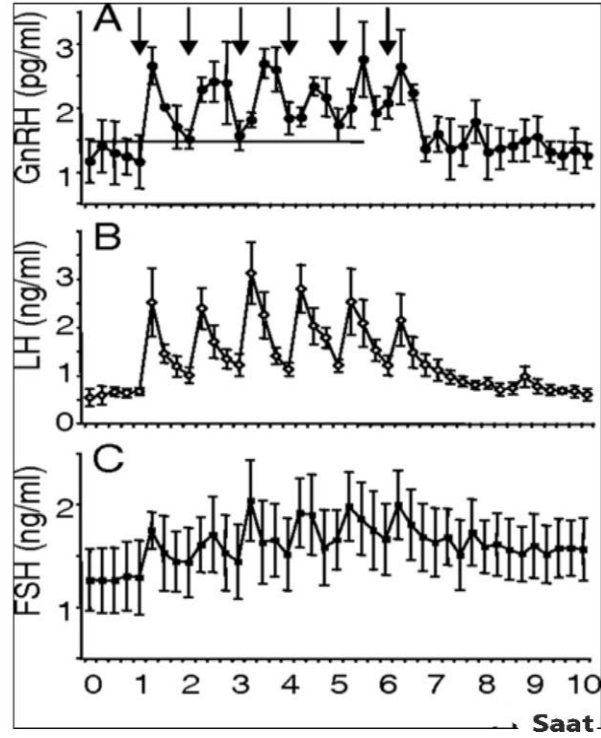


Şekil 6. Ovariectomize dişi koyunlardaki FSH ve LH (A ve B) salınımı üzerinde tek ve farklı dozlarda (100, 25, 6.2, ve 1.6 nmol/enjeksiyon) intravenöz yolla uygulanan hKp10 peptidinin etkileri. İlaveten farklı dozlardaki hKp10 peptidinin FSH ve LH salınımında yarattığı dinamik profiller (C ve D) ($P < 0.0083$) (Caraty ve diğerleri, 2007).

Caraty ve diğerleri (2007) farklı sekanslara sahip human kisspeptin 10 (hKp10) ve fare kisspeptin 10 (mKp10) peptidlerinin LH ve FSH üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Araştırmacılara göre koyun kiss1 gen sekansı C-terminal decapeptid yapısı ile fare C-terminal decapeptid yapısı benzerdir. Araştırmacılar anöstrus dönemindeki östrodiol uygulanmış OVX dişi koyunlara 6.2 nmol mKp10 ve hKp10 peptidlerinin i.v. yolla tek doz uygulanması sonucu her iki peptide (mKp10, hKp10) karşı meydana gelen dinamik LH ve FSH cevabında ve her iki hormon düzeyinde benzerlik görmüştür. Her iki peptidin uygulanmasından sonra LH düzeylerinin 2 saat içinde alt sınıra geri döndüğünü ve bu peptidlerin ani ve kısa süreli olan bir LH salınımı meydana getirdiğini bildirmektedirler.

Caraty ve diğerleri (2007) mevsimsel anöstrus dönemindeki östrodiol verilmiş OVX dişi koyunlara i.v. yolla etkin doz 6.2 nmol mKp10 peptidi uygulayarak enjeksiyondan 15-30 dakika sonra serebrospinal sıvıdaki (CSF) GnRH düzeyinin başlangıca göre konsantrasyonlarının arttığını ve maksimum GnRH düzeyinin yaklaşık 2 kata kadar yükseldiği gözlemlemiştir. Bu yüzden araştırmacıların yaptığı çalışmaya göre CSF'deki GnRH düzeyindeki artış ile plazma LH ve FSH düzeyleri etkilenmektedir. Fare Kp10 enjeksiyonundan sonra 45 dakika içinde CSF'deki GnRH konsantrasyonlarının ani bir şekilde ilk aşamadaki seviyelere düşmesi nedeniyle ani ve kısa süreli LH ve FSH salınımları GnRH salınımıyla ilişkilendirilmektedir. Lüteinleştirici hormon kisspeptine karşı FSH hormonundan daha büyük bir cevap oluşturmaktadır (Şekil 7; Caraty ve diğerleri, 2007).

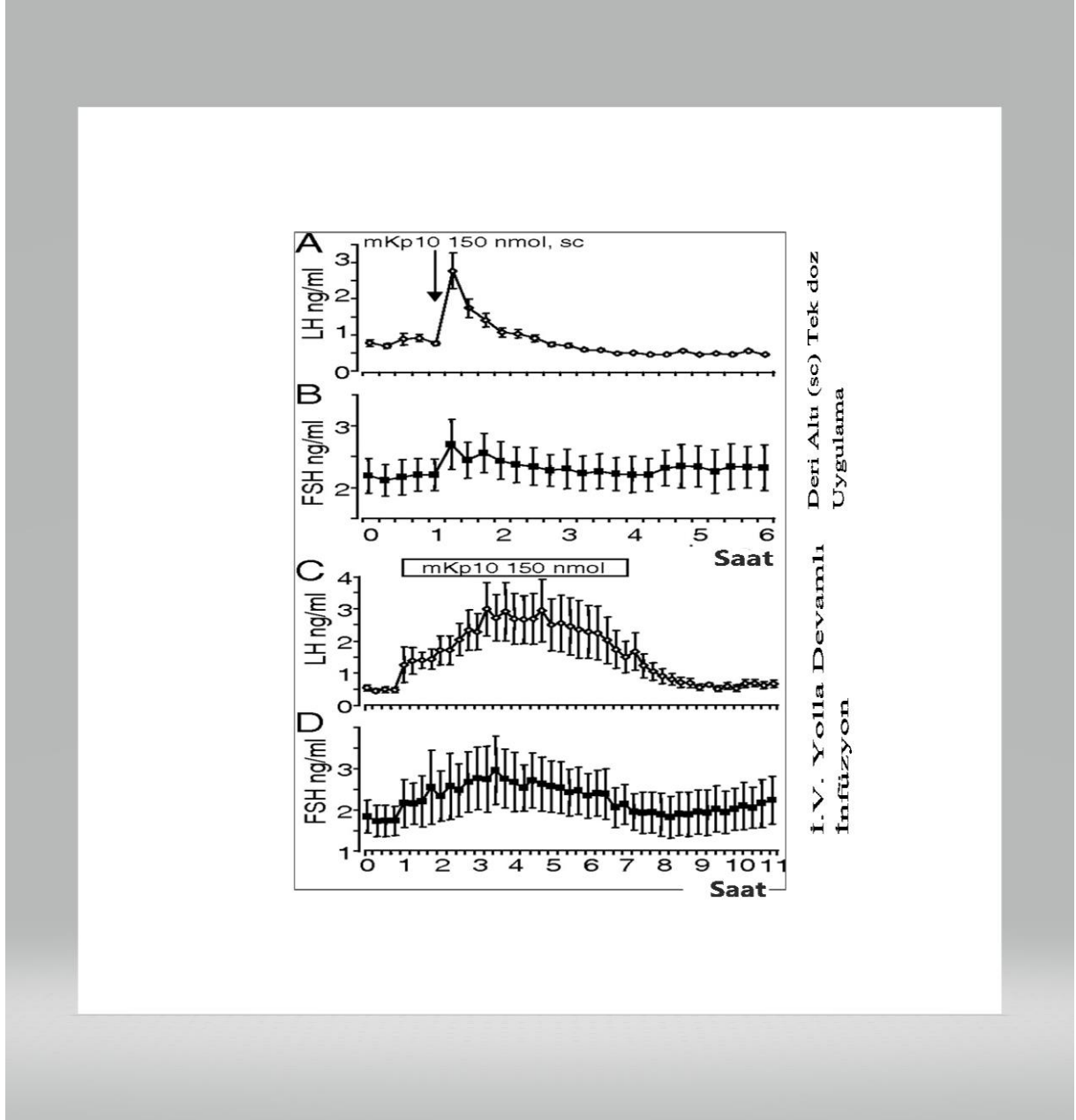
Sıçanlarda, maymunlarda ve koyunlarda kisspeptin uygulandıktan sonra serebro spinal sıvıda ölçülen GnRH hormonu düzeyleri her iki gonadotropinin (LH/FSH) GnRH uyarımıyla salındığını göstermektedir (Matsui ve diğerleri, 2004; Plant ve diğerleri, 2006; Caraty ve diğerleri, 2007). Diğer taraftan Kiss1 ve GPR54 reseptörünün peripubertal dişi ve erkek sıçanların hipofiz bezi hücrelerinde ekspresyonunun yapıldığı dolayısıyla da kisspeptinlerin direkt olarak hipofiz gonadotropinlerine etkisinin göz ardı edilemeyeceği de ileri sürülmektedir (Gutierrez-Pascual ve diğerleri, 2007). Kisspeptinlerin adenohipofiz üzerindeki direkt etkisinin tartışmalı durumunu koruduğu çünkü hipotalamo hipofizyal bağlantısı kesilmiş dişi koyunlarda kisspeptinlerin LH salınımını uyarmada başarısızlığa uğradığı bildirilmektedir (Smith ve diğerleri, 2008). Redmond ve diğerleri (2011) çalışmalarına göre prepubertal dişi kuzularda kisspeptinlerin gonadotropinler üzerindeki etkisini direkt olarak GnRH nöronları üzerinden gösterdiğini ve böylelikle LH salınımını uyardığını düşünmektedir.



Şekil 7. Fare Kp10 peptidinin 6.2 nmol dozda i.v. yolla tekrarlanan enjeksiyonlarının CSF içindeki GnRH (A) ve periferel dolaşımdaki LH (B) ve FSH (C) üzerine olan etkileri (Caraty ve diğerleri, 2007).

Kisspeptin 10 peptidinin ani klerensi ve her Kp10 enjeksiyonu ile artan LH düzeyinden sonra ani düşüş görülmektedir. Bu yüzden Caraty ve diğerleri (2007) anöstrus dönemindeki östrodiol uygulanmış OVX dişi koyunlarda sürdürülebilir bir gonadotropin salınımı sağlamak amacıyla hayvanlara deri altı yolla 150 nmol mKp10 enjeksiyonu ve aynı hayvanlara 15 gün sonra aynı dozda (150 nmol) mKp10 peptidinin saatte 500 µl (mikrolitre) akış hızıyla 6 (altı) saat boyunca 25 nmol dozunda sürekli damar içi infüzyonunu gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar peptidin i.v. yolla sürekli infüzyonunun plazma LH ve FSH düzeylerinde devamlılık sağladığını ve her iki hormonun düzeyindeki düşüşün ani olarak değil aşamalı olarak

gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Tek doz deri altı uygulamada ise gonadotropin düzeylerinin çok daha kısa sürede alt sınıra döndüğü görülmüştür (Şekil 8; Caraty ve diğerleri, 2007).



Şekil 8. Tek doz deri altı mKp10 ve devamlı i.v. yolla mKp10 infüzyonunun periferel dolaşımdaki LH ve FSH hormonları üzerine olan etkileri ($P<0,05$) (Caraty ve diğerleri, 2007).

Caraty ve diğerleri (2007)'ne göre üreme mevsimindeki siklik aktivite gösteren dişi koyunlara mKp10 peptidi uygulanması ile preovulator LH dalgası senkronize edilebilmektedir. İntravaginal progesteron (CIDR, 14 gün boyunca) uygulamasından sonra mKp10 peptidi ile kombine edilen çalışmalarında 8 saat boyunca akış hızı saatte 500 mikrolitre olacak şekilde

saatte 0.48 µmol (mikromol) toplamda 3.84 µmol mKp10 peptidinin dişi koyunlara devamlı i.v. infüzyonla uygulandığında fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol grubuna göre daha fazla sayıda hayvanda preovulator LH dalgalarının başladığı, LH düzeylerinin yükseldiği belirtilmektedir. Kontrol grubunda ise LH dalgaları başlatılmasının daha az hayvanda görülürken tutarsız bir şekilde değişken olduğu ve LH hormonunun mKp10 peptidinde olduğu gibi hızlı cevap vermediği bildirilmektedir. Plazma progesteron seviyelerinin mKp10 peptidi verilen hayvanlarda daha erken arttığı ve mKp10 peptidi uygulanan hayvanlarla kontrol grubu arasında önemli derecede farklılıklar gözlemlendiği bildirilmektedir. Peptid (mKp10) ve fizyolojik tuzlu su uygulaması yapıldıktan beş gün sonra ovaryumlarda yapılan muayenelerde iki grup arasında korpus luteum (CL) sayısında herhangi bir fark görülmemiştir.

Mevsimsel anöstrusteki dişi koyunlara aynı dozda uygulanan kisspeptinin hipotalamo hipofizyal gonadal aks ve ovulasyon üzerindeki etkilerine bakıldığında mKp10 peptidinin uygulama sürelerine göre farklı etkiler oluşturduğu gözlenmektedir. Aynı kisspeptin dozu kullanılarak i.v. yolla tekrarlanan doza (on iki saatte bir 5 defa Kp uygulaması) ve i.v. yolla sürekli infüzyona (akış hızı saatte 500 µl olacak şekilde 48 saat boyunca) maruz bırakılan hayvanlarda i.v. yolla fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol grubu hayvanlarına göre plazma LH düzeylerinde önemli derecede artış ve daha güçlü LH cevapları meydana gelmektedir. Deneysel çalışmaya göre i.v. yolla tekrarlanan doz kisspeptin uygulanan hayvanlarda LH konsantrasyonları yükselmesine rağmen ovulasyon meydana getirebilecek bir preovulator LH dalgası oluşmamıştır. Sürekli kisspeptin infüzyonu uygulanan hayvanların ise çoğunluğunda laparoskopik muayene ile gözlenen CL varlığına dayanarak ovulasyon meydana geldiği bildirilmektedir (Caraty ve diğerleri, 2007).

İntravenöz yolla verildiğinde kisspeptinlerin LH ve FSH salınımında güçlü bir uyarıcı olduğu, gonadotropinlerin kisspeptine olan cevaplarının büyük olasılıkla GnRH hormonunun uyarılmasından kaynaklı olduğu, devamlı kisspeptin infüzyonunun uzun süreli LH/FSH salınımı sağladığı, devamlı kisspeptin infüzyonunun koyun türünde çok yoğun LH dalgası ve ovulasyon meydana getirdiği, anöstrus dönem boyunca düşük dozdaki kisspeptin infüzyonunun asiklik dişi koyunlarda gonadotropin salınımını uyardığı, ovulasyonu başlattığı ve etkin dozun çok daha üzerinde dozlar kullanıldığında kisspeptinlerin LH cevabı üzerinde değişiklik oluşturmadığı belirtilmektedir (Caraty ve diğerleri, 2007).

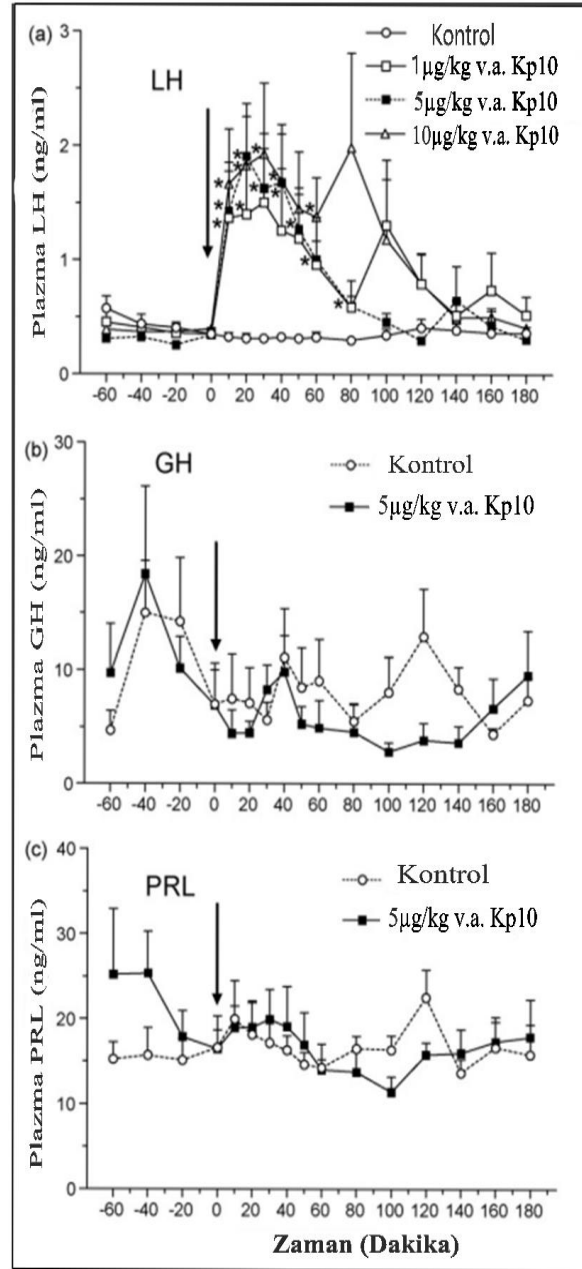
Caraty ve diğerleri (2007) 12.4 nmol/sa 30 ve 48 saat boyunca mKp10 peptidi infüzyonu ile (i.v. yolla) hayvanların %80'inde ovulasyon oluşturabilmiştir. Dişi koyunlarda mevsimsel anöstrüs boyunca tekrarlanan Kp10 enjeksiyonları uzun süreli LH ve FSH pulsları

oluşturmaktadır. Ancak bu uyarımlar LH dalgasını başlatmada yeterli değildir. Mevsimsel anöstrüste yapılan kisspeptin (oKp10) uygulaması ile en az $\geq$ %75 ovulator oran elde etmek için minimum 24 saat Kp10 infüzyonu yapılması gerekmektedir. Asiklik dışı koyunlara sistemik olarak Kp peptidi uygulanması ile uzun süreli bir E2 artışı sayesinde gonadotropin salınımı üzerindeki E2 pozitif feedback aktivasyonu tarafından LH dalgaları başlatılmaktadır (Sebert ve diğerleri, 2010).

Kisspeptin infüzyonu başlatıldıktan sonra E2 konsantrasyonu kısa zamanda artmaktadır. Östradiol implantı uygulanmış anöstrus dönemindeki ovariektomize dışı koyunlarda, devamlı Kp infüzyonu uygulamasından sonra ilk olarak artış görülmesi ve infüzyonunun sonlandırılmasından 3-4 saat sonra LH ve FSH konsantrasyonlarında aşamalı olarak geri düşüşün başlaması bifazik (E2 negatif feedback ile düşüş, E2 pozitif feedback ile artış) mekanizma ile ilişkilendirilmektedir.

Seminara ve diğerleri (2006) juvenil erkek hint al yanaklı maymunlarında yaptıkları çalışmada, LH düzeylerinin geri düşüşünü devamlı Kp (human metastin 45-54; kisspeptin 112-121 eşdeğerinde) infüzyonuna da bağlamaktadır. Dördüncü günden itibaren uygulanması devam edilen Kp infüzyonu GPR54'ün desensitizasyonu ile sonuçlanmıştır. Yani 4. güne kadar infüzyon başladıktan yaklaşık 3 saat sonra hareketli bir LH cevabı olduğu, 3. saatten sonra keskin bir düşüş meydana geldiği ve 4. günden sonra desensitizasyon ile sonuçlanmaktadır. Pampillo ve diğerlerine (2009)'ne göre kisspeptinlerin sürekli yani aralıksız uygulanması kisspeptin reseptörlerini duyarsızlaştırmaktadır. Araştırmacılar kisspeptin reseptörlerinin, sürekli kisspeptin uygulamasına karşı duyarsızlaşmasının sebebini tam açıklayamamakla beraber G-protein-çifti reseptörü (GPCR) kinaz 2 ile alakalı olduğunu düşünmektedirler.

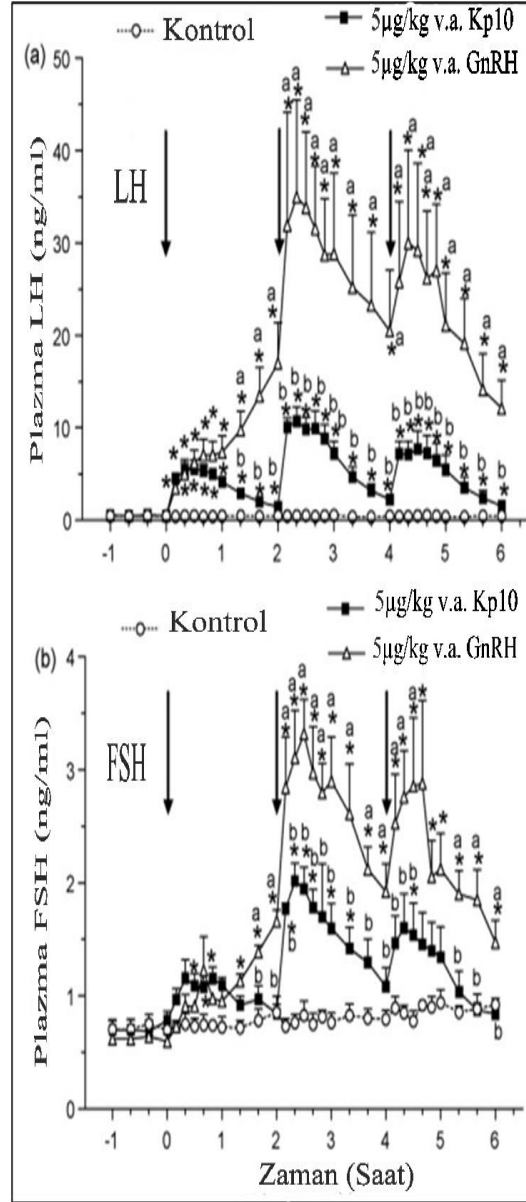
Östrus siklusunun luteal fazında olan östrus belirtileri göstermemiş olan Japon dışı keçilere i.v. yolla tek doz human Kp10 (1, 5, 10µg/kg) peptidi uygulanan hayvanlarda i.v. yolla serum fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol hayvanlarına göre çok daha yüksek plazma LH düzeyleri elde edilmiştir. Fakat 1, 5, 10 µg/kg tek doz hKp10 uygulanan hayvanlar arasında plazma LH düzeylerinde önemli bir farklılık görülememesine rağmen Hashizuma ve diğerleri, (2010) LH hormonu salınımındaki önemli artışın 1 µg/kg vücut ağırlığı dozdan daha fazla miktarda Kp-10 peptidi uygulandığında meydana gelebileceğini ileri sürmektedir. Human Kp10 (5 µg/kg) uygulanan hayvanlar ile kontrol hayvanları arasında plazma büyüme (GH) hormonu ve prolaktin (PRL) hormonu açısından değişiklik olduğu ama bu hormonların bazal düzeylerinde önemli bir farklılık olmadığı bildirilmektedir (Şekil 9; Hashizuma ve diğerleri, 2010).



Şekil 9. İntravenöz yolla verilen 1 µg/kg (LH), 5 µg/kg (LH, GH, PRL) ve 10 µg/kg (LH) hKp10 enjeksiyonuna karşı dişi keçilerin plazma LH, GH ve PRL cevapları ile fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol dişi keçilerinin plazma LH, GH ve PRL cevapları ($P<0,05$) (Hashizuma ve diğerleri, 2010).

İntravenöz yolla aynı dozda ve tekrarlı kisspeptin ve GnRH uygulamalarında LH düzeyleri hem Kp10 hem de GnRH enjeksiyonu sonrası artış göstermektedir. İlk enjeksiyonlardan itibaren GnRH enjeksiyonu uygulanan hayvanlarda Kp10 enjeksiyonu uygulanan hayvanlara göre daha aşamalı olarak yükselen ve daha önemli derecede LH düzeyleri elde edilmiştir. Aynı şekilde GnRH hormonu enjeksiyonu ile Kp-10 peptidine göre kayda değer

derecede daha fazla FSH hormonu salınımı meydana gelmiştir ve FSH konsantrasyonlarının aşamalı olarak arttığı görülmüştür. Bu iki peptidin sekretuvar modellerindeki (direkt-indirekt) farklılık önemlidir. Gonadotropin salgılatıcı hormon uygulanan hayvanlarda daha fazla peptidin direkt olarak hipofiz gonadotropinlerine ulaştığından ve hipofiz gonadotropinlerinde bulunan GnRH reseptörlerini etkilediğinden daha çok gonadotropin salınımı yarattığı düşünülmektedir. Kisspeptinlerin ise çoğunlukla hipotalamik bölümdeki GnRH nöronları vasıtasıyla LH ve FSH hormonu cevabı oluşturduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla Kp-10 peptidinin GnRH peptidi kadar etkili olmadığı belirtilmektedir (Şekil 10; Hashizuma ve diğerleri, 2010).



Şekil 10. Dişi keçilere bir dizi tekrarlanan Kp10 (5 µg/kg) ve GnRH (5 µg/kg) enjeksiyonları sonucu plazma LH (Kp10 ve GnRH) ve FSH (Kp10 ve GnRH) hormon seviyeleri cevaplarının kendi aralarında ve fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol grubu hayvanlarla karşılaştırılması ($P<0,05$) (Hashizuma ve diğerleri, 2010).

Bazı araştırmacılara göre türler arası maksimum LH salınımı etkisi oluşturan Kp10 dozları ovariektomize ineklerde Whitlock ve diğerleri (2008)'ne göre 0.13µg/kg vücut ağırlığı, ovariektomize dişi koyunlarda Caraty ve diğerleri (2007)'ne göre 0.54–0.65 µg /kg vücut ağırlığı, erkek ratlarda Tovar ve diğerleri (2006)'ne göre 3.90 µg/kg vücut ağırlığı, prepubertal düvelerde Kadokawa ve diğerleri (2008)'ne göre 4.76 µg /kg vücut ağırlığı dozlarında bildirilmektedir.

Redmond ve diğerleri (2011) ilkbahar doğumlu 28 haftalık prepubertal dişi kuzulara 24 saat boyunca her saat başı 20 µg toplamda hayvan başına 480 µg koyun kisspeptin 10 (oKp10) uygulayarak pubertas üzerine etkinlik araştırılmıştır. Hayvanların pubertasa ulaşım ulaşmadıklarını çalışma esnasında her 15 dakikada bir topladıkları kan örneklerinde incelenen plazma/serum LH, E2 ve progesteron hormonlarına göre belirlemişlerdir. Hem kisspeptin uygulanan prepubertal dişi kuzularda ve hem de serum fizyolojik tuzlu uygulanan kontrol dişi kuzularında ilk uygulamalar sonrasında seyrek LH pulslarının görüldüğü, uygulamaların başlatılmasından sonra tekrarlanan dozlarla beraber kisspeptin uygulanan dişi kuzularda artan LH puls frekansı ($P<0,02$) ve 18-24. saatlerde başlayan yaklaşık 12 saat süren LH dalgalarının oluştuğu bildirilmektedir ($P<0,05$). Kontrol dişi kuzularının hiçbirisinde böyle bir LH dalgası cevabı oluşmamıştır ($P<0,05$; Redmond ve diğerleri, 2011).

Uygulamaların başlatılmasından sonra 18. saatte kisspeptin uygulanan hayvanlarda kontrol hayvanlarına göre çok daha fazla E2 konsantrasyonu meydana geldiği gözlenmiştir ($P<0,02$). Artan E2 konsantrasyonu sonucu östrojen pozitif feedback mekanizması tarafından yönetilen POA Kiss1R etkisiyle kisspeptin uygulanan altı dişi kuzu içerisinde LH dalgası oluşan dört kuzuda çalışmanın başlatılmasından 5 gün sonra LH dalgası sonucu ovulasyon/foliküler luteinizasyona işaret eden 1ng/ml'nin üzerinde progesteron hormonu konsantrasyonları tespit edilmiştir. Fizyolojik tuzlu su uygulanan gruptaki dişi kuzuların hiçbirisinde progesteron hormonu artışı görülmemiştir. Dört kuzudan üçünde progesteron hormonu konsantrasyonları kısa süreliğine artmıştır ve bu ilk artışın başlamasından 2-3 gün sonra progesteron düzeyleri 1ng/ml'nin altına düşmüştür. Luteal aktivite göstermiş olan bu dört dişi kuzudan sadece birisinin uzayan periyotlarda dolaşımdaki yüksek progesteron konsantrasyonunu koruduğu bildirilmektedir (Redmond ve diğerleri, 2011).

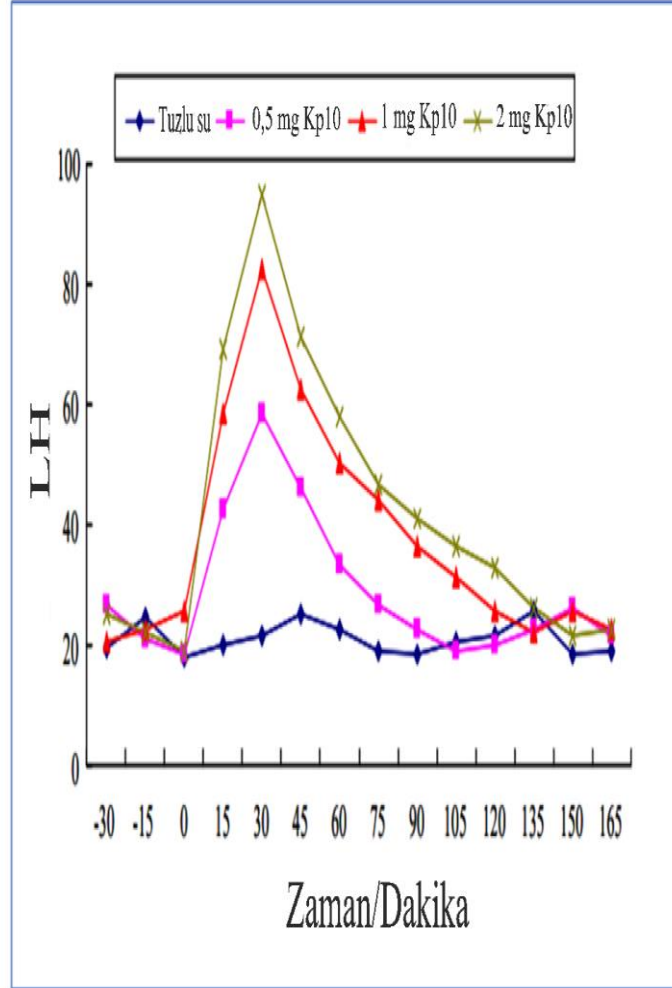
Redmond ve diğerleri (2011) çalışmalarının sonuçlarına göre tekrarlanan kisspeptin enjeksiyonlarının prepubertal dişi kuzularda LH puls benzeri salınım oluşturduğunu, tekrarlanan kisspeptin enjeksiyonu uygulamasının ovaryum steroidogenezisini artırarak preovulatör LH dalgaları ve ovulasyon meydana getirebildiğini ama luteal aktivitenin kısa

sürekli (2-3 gün) geliştiğini ve düzenli östrus siklusunun görüldüğü yaş bakımından bir ilerleme gösteremediklerini belirtmektedir. Hayvanlar 35 haftalık iken hem kisspeptin grubu hem de kontrol grubu hayvanları karşılaştırıldığında her iki grubun da pubertase ulaştıkları tespit edilmiştir ve kisspeptinlerin daha çok lüteal aktivitede etkin olduğu görülmüştür.

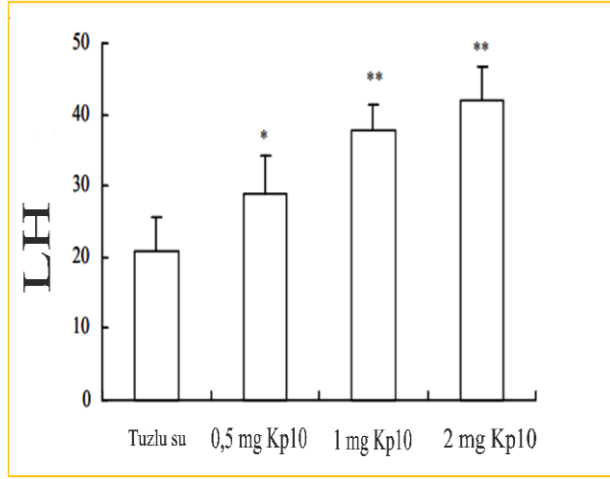
Dişi kuzularda sık aralıklarda pulsatil LH salınımı, arkuat çekirdekteki KİSS1 ekspresyonundaki artış ile alakalıdır. Bu yüzden foliküler gelişimin son aşamasını destekleyen (koyunlarda saatte yaklaşık 1 LH pulsu ile) ve düzenli östrus siklusunu oluşturan LH pulsatil salınımı ile pubertase geçiş aşamasında, GnRH nöronal fonksiyonları üzerinde kisspeptinler kritik bir rol oynamaktadır. Güncel çalışmalar, kisspeptinlerin tekrarlanan dozları ile LH salınımının aralıklı olarak uyarılmasının prepubertal dişi kuzuların gonadal aktivitelerini indüklemeye etkili olduğunu göstermektedir. Kisspeptin uygulamasını takiben ovulasyon gösteren dişi kuzularda düzenli östrus siklusunun meydana gelmemesi ise nöroendokrin aksların yeteri kadar olgunlaşmamış olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Redmond ve diğerleri, 2011).

Prepubertal dişi kuzularda yapılan bir başka çalışmada iki çalışma grubu dizaynı yapılmıştır. Buna göre; birinci çalışma dizaynında 12 (on iki) prepubertal dişi kuzunun rastgele dört gruba ayrıldığı (n=3) ve bu kuzulara vena jugularisten kisspeptin enjeksiyonu yapılacağı gün kuzulardan sabah saat 8:00 ve 11:00 (180 dakika) arasında serum elde etmek için 15 dakika aralıklarla 5 ml kan örneği toplandığı belirtilmektedir. Bu saatler aralığında üçüncü kan örneği alınır alınmaz 5 ml serum fizyolojik sıvıda çözünmüş Kp-10 peptidi dört gruba sırasıyla 0, 0.5, 1, 2 mg miktarda tek doz olarak uygulanmıştır. İkinci çalışma dizaynında ise yine aynı ırk 6 (altı) prepubertal dişi kuzunun iki gruba ayrılarak (n=3) birinci çalışma dizaynındakine benzer şekilde sabah 8:00 ve 11:30 (210 dakika) saatleri aralığında 15 dakikada bir kan örneği toplanarak, üçüncü kan örneği alınır alınmaz 0 ve 1 mg Kp-10 peptidi her saat başı tekrarlanan dozlar olarak 3 (üç) defa damar içi uygulanmıştır (Wang ve diğerleri, 2012).

Prepubertal dişi kuzulara i.v. yolla tek doz 0.5, 1 ve 2 mg kisspeptin uygulanan grupların serum fizyolojik uygulanan kontrol grubuna kıyasla uygulamadan sonra 15 dakika içerisinde önemli derecede LH salınımını meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Lüteinleştirici hormon konsantrasyonları kisspeptin 10 peptidinin 0.5, 1 ve 2 mg enjeksiyonlarından sonra artmıştır (Şekil 11 ve 12; Wang ve diğerleri, 2012).



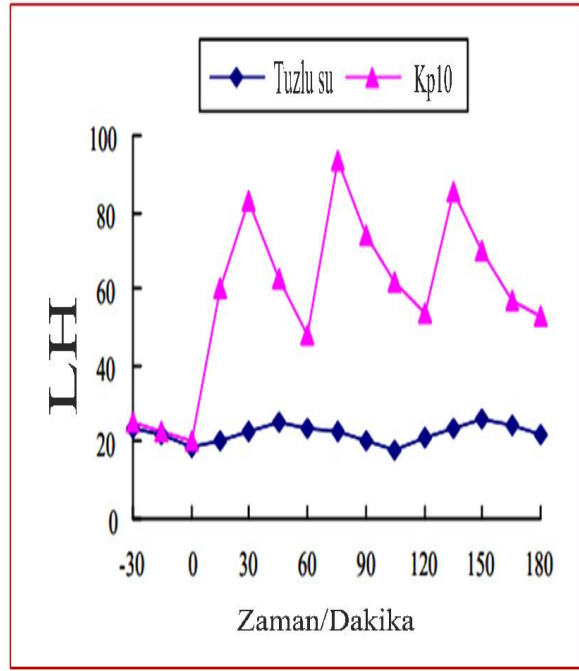
Şekil 11. Fizyolojik tuzlu suda (5ml) çözündürülmüş Kp10 peptidinin prepubertal dişi kuzulara intravenöz enjeksiyonla 0, 0.5, 1, 2 mg dozlarda uygulandıktan sonra 180 dakika boyunca serum LH konsantrasyonlarındaki değişimler (Wang ve diğerleri, 2012).



Şekil 12. Fizyolojik tuzlu suda (5ml) çözündürülmüş Kp10 peptidinin prepubertal dişi kuzulara intravenöz enjeksiyonla 0, 0.5, 1, 2 mg dozlarda uygulandıktan sonra ortalama LH konsantrasyonları bakımından Kp10 peptidi uygulanan prepubertal kuzular ile tuzlu su enjekte edilen kontrol grubu prepubertal kuzularının karşılaştırılması (* $p<0.05$, ** $p<0.01$) (Wang ve diğerleri, 2012).

Kisspeptin-10 peptidinin 1 mg ve 2 mg ($p<0.01$) uygulandığı prepubertal dişi kuzularda LH pik ve ortalama değerlerinin 0.5 mg Kp-10 uygulananlara göre çok daha fazla olduğu görülmüştür. Diğer yandan 1 ve 2 mg doz uygulanan hayvanlar arasında ise bu LH pik ve ortalama değerlerinde önemli derecede bir farklılık gözlenmemiştir. Kisspeptin 10 enjeksiyonundan sonra 15 dakika içerisinde artan LH sekresyonun 30. dakikada pike ulaştığı belirtilmektedir. İkinci çalışmada ise Kisspeptin-10 peptidinin tekrarlayan enjeksiyonlarının ($p<0.01$) için LH salınımını önemli derecede artırdığı belirtilirken tekrarlanan kisspeptin-10 enjeksiyonları ile Kp-10 peptidinin LH salınımı üzerindeki etkinliğinde bir değişiklik

oluşturulamadığı yani tekrarlanan dozların ek bir etki ortaya koymadığı bildirilmektedir (Şekil 13). Sonuç olarak prepubertal dişi kuzularda kisspeptin-10 peptidinin tek doz enjeksiyonları (0.5, 1, ve 2mg) ve saat başı tekrarlanan 1mg doz enjeksiyonları LH salınımında önemli derecede artış meydana getirmiştir (Wang ve diğerleri, 2012). Hashizuma ve diğerleri (2010) çalışmalarında yetişkin keçilere 2 saat aralıkla peş peşe kisspeptin-10 enjeksiyonları uygulayarak LH salınımını artırmıştır ve benzer sonuçlar elde etmiştir. Hashizuma ve diğerleri (2010) keçilerde kisspeptin-10 peptidinin LH salınımı üzerindeki etki süresinin Kp-10 enjeksiyon dozunun artırılmasıyla uzatılabileceğini belirtmiştir.



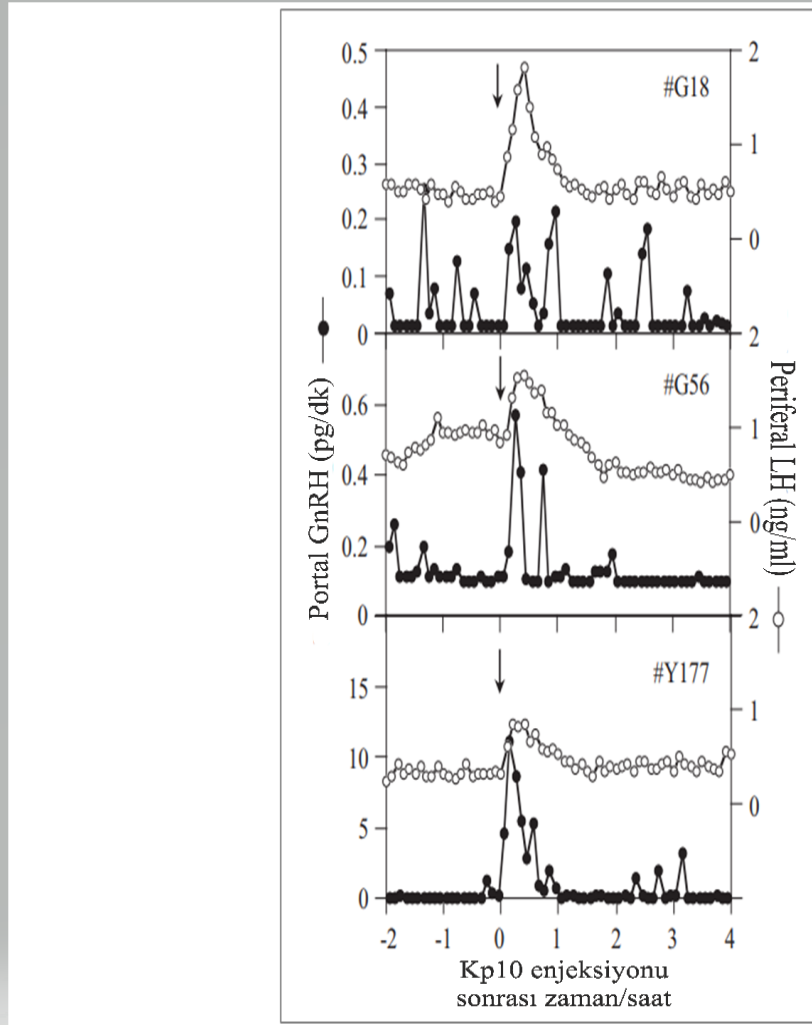
Şekil 13. Fizyolojik tuzlu suda (5ml) çözündürülmüş Kp10 peptidinin prepubertal dişi kuzulara 1mg dozda 1 saat aralıkla 3 kez tekrarlanan intravenöz enjeksiyonların 210 dakika boyunca serum LH konsantrasyonlarında meydana getirdiği değişimler ($p<0.01$) (Wang ve diğerleri, 2012).

Tena-Sempere (2006) 1 pmol kisspeptin-10 enjeksiyonunun pubertal erkek ratlarda maksimum bir LH salınımı sağladığını ama juvenil (pubertas öncesi) ratlarda böyle bir etkinin oluşmadığını, juvenil ratlarda LH salınımını uyarmak için daha yüksek dozda kisspeptin-10 enjeksiyonuna ihtiyaç duyulduğunu ve Kisspeptin-10 peptidinin LH salınımı üzerindeki etkisinin fizyolojik statüye göre değişebileceğini belirtmektedir. Castellano ve diğerleri (2006)'ne göre prepubertal dönemde LH salınımını uyarmak için gerekli olan daha yüksek doz Kp ihtiyacı pubertas öncesi dönemde yani postnatal gelişimde neonatal dönemden juvenil döneme kadar reproduktif aksın inhibe edici etkisinden kaynaklanmaktadır. Han ve diğerleri (2005) kisspeptin ve GPR54 reseptörünün pubertas üzerindeki rolünü incelediklerinde, yetişkin erkek ve dişi farelerde kisspeptinlerin, güçlü ve kalıcı bir GnRH hormon depolarizasyonu (%90'ın üzerinde) meydana getirdiğini gözlemlemiştir. Buna karşın Han ve diğerleri (2005) kisspeptinlerin juvenil dönemde (postnatal 8. günden postnatal 19. güne kadar) %27 oranda GnRH nöronunu, prepubertal (postnatal 26. günden postnatal 33. güne kadar) %44 oranında GnRH nöronunu aktive edebildiğini ve dolayısıyla pubertasa geçişte güçlü bir LH cevabı ortaya çıkarmak için daha fazla kisspeptin dozuna ihtiyaç duyulduğunu bildirmektedir.

Kisspeptin enjeksiyonlarının reproduktif aks üzerindeki etkisi türlerin fizyolojik evrelerine, hayvanların fizyolojik durumlarına, uygulanan enjeksiyon dozuna ve enjeksiyonun zamanlamasına (aralıklı veya ardışık enjeksiyon) bağlı olarak değişmektedir (Wang ve diğerleri, 2012).

Keçilerde GnRH pulsatil salınımını yöneten hipotalamik nöral jeneratörün, Kp-10 ile uyarılmış LH salınımıyla direkt bir alakasının olmadığı öne sürülmektedir. Suziki ve diğerleri (2008) hem domuz hem bovine türlerinin ön hipofiz hücrelerinde yaptıkları çalışmada belli dereceler arasındaki Kp10 peptidi konsantrasyonlarının direkt LH salınımını uyardığını ama sonuç olarak bu uyarımın zayıf olduğunu belirtmektedir. Ezzat ve diğerleri (2010) sığır ön hipofiz hücrelerinde gerçekleştirdikleri araştırmada Kp-10 peptidi uygulamasıyla ön hipofiz hücrelerinden LH, FSH ve PRL salınımının uyarıldığını fakat Kp10 peptidinin bu hormonlar üzerindeki uyarıcı etkisinin bir GnRH veya thyrotropin salıcı hormonun (TRH) yarattığı etki kadar olmadığını ve daha düşük etkiye sahip olduğunu bildirmektedir. Bu yüzden araştırmacılar ovariectomize dişi keçilerde Kp-10 peptidini intravenöz yolla uygulayarak Kp-10'un hipofiz portal dolaşımındaki GnRH konsantrasyonları üzerindeki etkisini araştırmıştır. Kp-10 verildikten hemen sonra GnRH ve LH plazma konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür (Şekil 14). Tanaka ve diğerleri (2012) Kp-10 uygulanmasından sonra GnRH aracılı mekanizmanın direkt olarak etkilendiğini buna paralel olarak LH salınımının meydana geldiğini

belirtmektedir. GnRH aracılı mekanizmanın kisspeptinin uyarıcı etkisinde daha büyük bir role sahip olduğunu, hipofizdeki etkisinin ise belki de küçük bir role sahip olduğunu ileri sürmektedirler. Keçilerde yaptıkları çalışmada kisspeptinlerin i.v. yolla uygulanmasıyla direkt olarak hipofizyal portal dolaşım içine GnRH hormonunun nörosekresyonu ve buna eşlik eden periferik LH konsantrasyonlarının artışı gözlenmiştir. Kisspeptinler tekrarlanan dozlarda uygulandığında veya hipotalamik alanda mevcut olduğu sürece GnRH nöronları üzerinde etkisini göstererek gonadotropinlerin salınımını sağlamaktadır (Tanaka ve diğerleri, 2012).



Şekil 14. Ovariectomize ve Kp10 uygulanmış (500 µg/keçi) üç dişi keçiden 6 dk aralıklarla toplanan örnekler sonucu hipofizyal portal dolaşımdaki GnRH profilleri ve periferik dolaşımdaki LH profilleri (Tanaka ve diğerleri, 2012).

Kisspeptin 10 peptidinin yavaş ve sürekli infüzyonu mevsimsel anöstrüsteki dişi koyunlarda gonadotropin salınımını uyarmaktadır ve ovulasyon başlatmaktadır. Deneysel çalışmaya göre 20 µg bolus enjeksiyonu ve 20 µg/saat Kp10 infüzyonunda, 10 µg bolus enjeksiyonu ve 10 µg/saat Kp10 infüzyonuna göre doza bağlı olarak daha fazla GnRH salınımı cevabı olduğu ve infüzyon ile çok az daha fazla LH salınımı meydana geldiği belirtilmektedir. Bolus Kp10 enjeksiyonu (hem 20 hem de 10 µg) ile hipofizyal portal dolaşımda keskin bir GnRH pulsu başladığı ve periferik dolaşımda göze çarpan LH pulsarı görülmüştür. Buna karşılık Kp10 peptidinin hem 20 hem de 10 µg dozda 4 saat boyunca sürekli infüzyonu kalıcı artan bir GnRH salınımı başlatmıştır. Çalışmaya göre araştırmacılar Kp10 peptidinin daha çok endojen GnRH pulsalarının kontrolünden sorumlu olduğunu ileri sürmektedir (Caraty ve diğerleri, 2013).

Mevsimsel anöstrüsteki Abadeh ekotip dişi keçilerine i.v. yolla 1 µg/kg Kp10 uygulamasının LH hormonu salınımını uyarmadığı, kisspeptinlerin düşük dozlarının keçilerde etkinliğinin olmadığı görülmüştür (Arjmand ve diğerleri, 2014).

Mevsimsel anöstrüs dönemi yaz mevsimi (Malpoux, 2006), üreme mevsimine geçiş dönemi ise yaz mevsimi sonlarına doğru başlayan (Rivera ve diğerleri, 2003; Farshad ve diğerleri, 2008) koyun ve keçiler ile ilgili Arjmand ve diğerleri (2014) yaz mevsiminde mevsimsel anöstrüsteki Abadeh ekotip dişi keçilerine teke katımı ile dişi keçilerde lüteal aktivitenin ve östrus davranışlarının görüldüğünü bildirmektedir. Çalışmaya göre erkek etkisi ile feromonların amygdala kisspeptin nöronlarını etkilediği ve bu nöronların reproduktif aksı aktive ettiği düşünülmektedir.

Okamura ve diğerleri (2013) Tablo 1, Arjmand ve diğerleri (2014) Tablo 2 ile Decourt ve Beltramo (2018) Tablo 3 diğer araştırmacıların türlere, cinsiyete, reproduktif statüye, peptid tipine veya analoglarına, uygulama yollarına ve uygulama dozlarına göre kisspeptinlerin kullanımlarını açıkladığı literatürleri aşağıdaki tablolarda belirtmektedirler.

Tablo 1. Çeşitli evcil hayvanlarda intravenöz Kp-10 peptidi uygulamasının LH hormonu uyarımında etkili olduğu doz miktarları.

Hayvan Türü	Yaş	Cinsiyet	Gonadal Statü ve Steroid	Kisspeptin Dozu	Referans
İnek	Prepubertal	Erkek/Dişi	Sağlıklı	3.9 nmol/kg BW	Ezzat ve diğerleri (2009)
	Yetişkin	Dişi	OVX	0.1 nmol/kg BW	Whitlock ve diğerleri (2008)
		Dişi	OVX+E2	0.1 nmol/kg BW	Whitlock ve diğerleri (2008)
Koyun	Yetişkin	Dişi	Sağlıklı (Üreme M.)	15.6 ve 39 nmol/head	Smith ve diğerleri (2009,2011)
		Dişi	Sağlıklı (Anöstrüs)	15.6 nmol/head	Smith ve diğerleri (2009)
		Dişi	OVX+E2 (Anöstrüs)	6 nmol/head	Caraty ve diğerleri (2007)
Keçi	Pre ve post pubertal	Erkek	Sağlıklı	3.9 nmol/kg BW	Saito ve diğerleri (2012)
	Yetişkin	Erkek	Kastre edilmiş	390 nmol/head	Okhura ve diğerleri (2009b)
		Dişi	Sağlıklı (Luteal Faz)	0.77 nmol/kg BW	Hashizuma ve diğerleri (2010)
Domuz	Prepubertal	Dişi	Sağlıklı	780 nmol/head	Lents ve diğerleri (2008)
At	Yetişkin	Dişi	Sağlıklı (Luteal Faz)	390 nmol/head	Magee ve diğerleri (2009)

BW: Body Weight-Vücut Ağırlığı, E2: Östradiol, OVX: Ovariektomize, Head: Hayvan Başına

Tablo 2. Memeli türlerine uygulanan farklı tiplerdeki ve dozlardaki kisspeptinlerin LH hormonu salınımı üzerine olan etkilerinin literatürlere göre dağılımı

Tür	Cinsiyet	Reproduktif Statü	Peptid Tipi	Uygulama Yolu*	Uygulanan Doz	Referans
İnsan	Erkek	Yetişkin	Kp54	İV	4 pmol kg ⁻¹ /dk (90 dk boyunca)	Dhillon ve diğerleri (2005)
İnsan	Erkek	Yetişkin	Kp10	İV	0.01-3.0 µg kg ⁻¹	George ve diğerleri (2011)
İnsan	Dişi	Menstrüasyon	Kp54	SC	0.4 nmol kg ⁻¹	Dhillon ve diğerleri (2007)
İnsan	Dişi	Hipotalamik Amenore	Kp54	SC	6.4 nmol kg ⁻¹ (Günde iki kere, iki hafta boyunca)	Jayasena ve diğerleri (2009)
Fare	Erkek	Yetişkin	Kp10	ICV	1 fmol	Gottsch ve diğerleri (2004)
Fare	Erkek	Yetişkin	Mouse Kp105-119	IP	100 µl of 10 µM	Messenger ve diğerleri (2005)
Rat	Dişi/Erkek	Yetişkin	Rodent Kp10	ICV	1 nmol	Navarro ve diğerleri (2004)
Rat	Erkek	Yetişkin	Kp10	ICV/Periferik	3 nmol	Thompson ve diğerleri (2004)
Rat	Erkek	Yetişkin	Kp54	ICV	1, 10 ve 100 pmol	Patterson ve diğerleri (2006)
Rat	Erkek	Yetişkin	Kp52	ICV	0.1 nmol	Pheng ve diğerleri (2009)

Tablo 2. Devamı

Rat	Erkek	Yetişkin	Rat Kp10 Human Kp10	ICV	1 nmol	Pheng ve diğerleri (2009)
Rat	Erkek	Yetişkin	Rat Kp52	IV	10 nmol kg ⁻¹	Pheng ve diğerleri (2009)
Rat	Erkek	Yetişkin	Kp10	IV	0.3 nmol kg ⁻¹	Tovar ve diğerleri (2006)
Rat	Erkek/Dişi	Prepubertal	Metastin (Kisspeptin)	SC	100 nmol kg ⁻¹ (erkek) 6.7 nmol (dişi)	Matsui ve diğerleri (2004)
Rat	Dişi	Siklik/Gebe/Laktasyonda	Kp10	ICV	0.1 pmol - 1 nmol	Roa ve diğerleri (2006)
Maymun	Erkek	Agonadal juvenil	Human Kp45-54	İV	10 µg	Seminara ve diğerleri (2006)
Maymun	Erkek	Yetişkin	Human Kp45-54	İV	Her saat başı 200-400 µg	Ramaswamy ve diğerleri (2007)
Maymun	Erkek	Agonadal juvenil	Kp10	ICV/IV	30 µg veya 100 µg	Shahab ve diğerleri (2005)
Domuz	Erkek/Dişi	Prepubertal	Murine Kp	ICV/Peripheral	10 veya 100 µg 1, 2.5, veya 5 mg	Lents ve diğerleri (2005)
Koyun	Dişi	Ovariectomize	Ovin Kp	İV	3 mg	Arreguin-Arevalo ve diğerleri (2007)

Tablo 2. Devamı

Koyun	Dişi	Östradiol uygulanmış ovarietomize	Human Kp112-121	ICV	4 saat boyunca dakikada 0.2 µg	Messenger ve diğerleri (2005)
Koyun	Dişi	Östradiol uygulanmış ovarietomize	Human Kp10	İV	6 nmol	Caraty ve diğerleri (2007)
Koyun	Dişi	Anöstrus Dönemi	Murine Kp10	İV	30-48 saat boyunca her saatte 12.4 nmol	Caraty ve diğerleri (2007)
Koyun	Dişi	Üreme Mevsimi	Murine Kp10	İV	8 saat boyunca her saate 0.48 µmol	Caraty ve diğerleri (2007)
Koyun	Dişi	Anöstrus Dönemi	Kp10	İV	Saatte 15.2 nmol	Sébert ve diğerleri (2010)
Keçi	Erkek	Yetişkin	Kp10	İV	5 µg kg ⁻¹	Saito ve diğerleri (2012)
Keçi	Dişi	Luteal Faz	Kp10	İV	1, 5 ve 10 µg kg ⁻¹	Hashizume ve diğerleri (2010)
Welsh pony	Dişi	Siklik Dönemde	hKp10	İV	10 mg	Briant ve diğerleri (2006)
İnek	Dişi	Prepubertal	Kp10	İV	1 mg	Kadokawa ve diğerleri (2008)
İnek	Erkek/Dişi	Prepubertal	Kp10	İV veya İM	5 µg kg ⁻¹	Ezzat ve diğerleri (2009)
İnek	Dişi	Siklik Dönemde	Kp10	İV	100 veya 200 pmol kg ⁻¹	Whitlock ve diğerleri (2008)

*ICV: Intracerebroventricular; SC: Subcutaneous; IV: Intravenous; IP: Intraperitoneal; IM: Intramuscular

Tablo 3. Dişi koyunlara Kisspeptin 10 (Kp10) ve Kp10 analogları (FT080, Compound 17 ve C6) uygulandıktan sonra gonadotropin/steroid salınımı ve ovulasyon üzerinde gözlenen etkilerin özeti.

Molekül	Koyunların Reprodüktif Durumu	Doz ve uygulama yolu	Gonadotropin/Steroid/Ovulasyon Üzerindeki Etkiler	Referans
Kp10	Prepubertal (28haftalık)	20 µg/sa (24 saat boyunca) İV yolla	LH pulslarında artış Ovulasyon meydana geldi	Redmond ve diğerleri (2011)
Kp10	Nonsiklik	6 nmol, İV yolla	Her enjeksiyon sonrası LH ve FSH artışı	Caraty ve diğerleri (2007)
Kp10	Nonsiklik	15.2 nmol/sa (24 saat boyunca) İV yolla	LH ve E2 artışı Ovulasyon meydana geldi	Sebert ve diğerleri (2010)
Kp10	Yetişkin (folliküler faz)	0.48 µmol/sa (8 saat boyunca) İV yolla	LH dalgası ve Ovulasyon başlatıldı	Caraty ve diğerleri (2007)
FT080	Yetişkin nonsiklik	0.5, 2.5 ve 5 nmol/kg, İV yolla	Uygulanan bütün dozlarda kısa süren LH artışı	Whithlock ve diğerleri (2015)
Compound 17	Yetişkin nonsiklik	15 nmol, İV yolla	LH ve FSH hormonlarında sırasıyla yaklaşık 9 ve 5 saat boyunca artış görüldü	Beltramo ve diğerleri (2015)
C6	Yetişkin (folliküler faz)	15 nmol, İM yolla	Yaklaşık 12 saat boyunca LH ve FSH artışı görüldü Ovulasyon meydana geldi	Decourt ve diğerleri (2016)
C6	Yetişkin nonsiklik	15 nmol, İM yolla	Yaklaşık 12 saat boyunca LH ve FSH artışı görüldü Ovulasyon meydana geldi	Decourt ve diğerleri (2016)

Verilen bu bilgiler ışığında, pubertas üzerine kisspeptin molekülü etkisinin küçük ruminant türlerinden çoğunlukla koyunlarda araştırıldığı keçilerde ise daha kısıtlı çalışmaların yapıldığı görüldü. Sunulan tez çalışmasında keçilerde, pubertas üzerine etkili olduğu düşünülen kisspeptin molekülü izoformu human Kp-10 peptidinin etkisini değerlendirmek amaçlandı. Ayrıca prepubertal oğlaklara kisspeptin uygulaması ile daha erken pubertasa ulaştırılması ve daha erken yaşta seksüel olgunluk sonucu çiftleştirme sağlayarak pubertas ve damızlık kullanma aralığının azaltılması hedeflenerek uygulama sonrası gebelik, doğum ve fertilité üzerinde uygulamanın etkinliğinin araştırılması da amaçlarımız arasındadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışma Şubat 2021 – Haziran 2022 tarihleri arasında Aydın ili ve Nazilli ilçesindeki özel yetiştiricilere ait küçükbaş hayvan işletmelerinde gerçekleştirildi. İşletmedeki tüm hayvanlar aynı çevre şartlarında ve kapalı ağılda barındırıldı. Çalışmanın hayvan materyalini yaklaşık 5 aylık, doğum zamanı 1 Şubat – 15 Mart 2021 tarihleri aralığında olan ve ortalama 26-27 kg vücut ağırlığına sahip, sağlıklı, sütten kesilmiş enerji bakımından zengin kaliteli ot ve konsantre yemlerle beslenen, su ihtiyaçları ad libitum olarak karşılanan prepubertal 30 adet dişi oğlak oluşturdu.

Prepubertal dişi oğlaklar (Grup A- n=10, Grup B- n=10, Grup C- n=10) rastgele üç gruba ayrıldı. Grup A farklı zamanlarda intravenöz yolla tekrarlanan iki doz human kisspeptin 10 uygulanan araştırma grubu hayvanlarını; Grup B intravenöz yolla tek doz human kisspeptin 10 uygulanan araştırma grubu hayvanlarını; Grup C ise plasebo amaçlı intravenöz yolla serum fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol grubu hayvanlarını oluşturmaktadır.

Çalışma materyalini oluşturan dişi oğlaklar, keçilerde görülen hiyerarşi nedeniyle ortaya çıkabilecek beslenme yetersizliği ihtimaline karşılık diğer hayvanlardan (anaç keçi, çepiç, erkek, teke) farklı bir ağılda barındırıldı ve tek bir ağılda takibe alındı.

Çalışmadaki uygulamalar başlatılmadan önce 5 ağıla kadar tüm prepubertal dişi oğlakların gelişimleri ve beslenmeleri takip edildi. Çalışma başlangıcından itibaren vücut ağırlıkları ve vücut sıcaklıkları kayıt altına alınıp genel durumları kontrol edildi. Çalışmanın sonuna kadar seçtiğimiz hayvan materyallerinde herhangi bir sağlık problemi ve ölüm gerçekleşmedi. Çalışma, ilk başta seçilen prepubertal dişi oğlaklar üzerinde sorunsuz bir şekilde yürütüldü.

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Biyolojik Ürünler

Çalışmada intravenöz yolla verilen peptidin doz hesaplamasının yapılabilmesi ve hayvanların gelişimlerinin takibi amacıyla her uygulama öncesi prepubertal dişi oğlakların vücut ağırlığı ölçüldü. Hareketliliği fazla olan oğlaklarda rahat ve doğru bir vücut ağırlığı ölçümü yapabilmek için kafes tarzı elektronik baskül kullanıldı (Resim 1A).

Kan alımı için 9 ml'lik K2E (K2 EDTA) (Resim 1B), kan alma holderi (Resim 1C), kan alma iğnesi (21G yeşil) (Resim 1D) ve intravenöz yolla enjeksiyon amacıyla 2 ml'lik yeşil uzun uçlu tek kullanımlık enjektörler kullanıldı (Resim 1E).

Alınan kan örneklerinden serum çıkarma işlemi Nüve NF 800R soğutmalı santrifüj aracılığıyla yapıldı. Elde edilen kan serumu numunelerinin -18°C'de muhafazası için 2ml'lik mikrotüpler kullanıldı (Resim 1F).

Toplanan kan serumlarındaki progesteron hormonu ölçümü için BT LAB Goat Progesterone ELISA Kit (Cat.No: EA0005Go) ile Elisa testi yapıldı (Resim 4).

Ultrasonografik gebelik muayenesi için SIUI CTS-800 ultrason cihazından faydalanıldı (Resim 1G).

Son olarak çalışmanın başlangıcından itibaren esansiyel olarak kullanılan prepubertal dişi keçilerde pubertas ve fertilité üzerine etkinliğini araştırdığımız bir kisspeptin molekülü olan 2 miligram Kisspeptin – 10 human (Kp 10; human bir kisspeptin izoformu) [Kisspeptin-10 (Cat. No. 2570. Tocris Bioscience, U.S.A.)] ürününden ve plasebo amaçlı fizyolojik tuzlu sudan (1 ml %0,9 NaCl, i.v.) yararlanıldı (Resim 3).



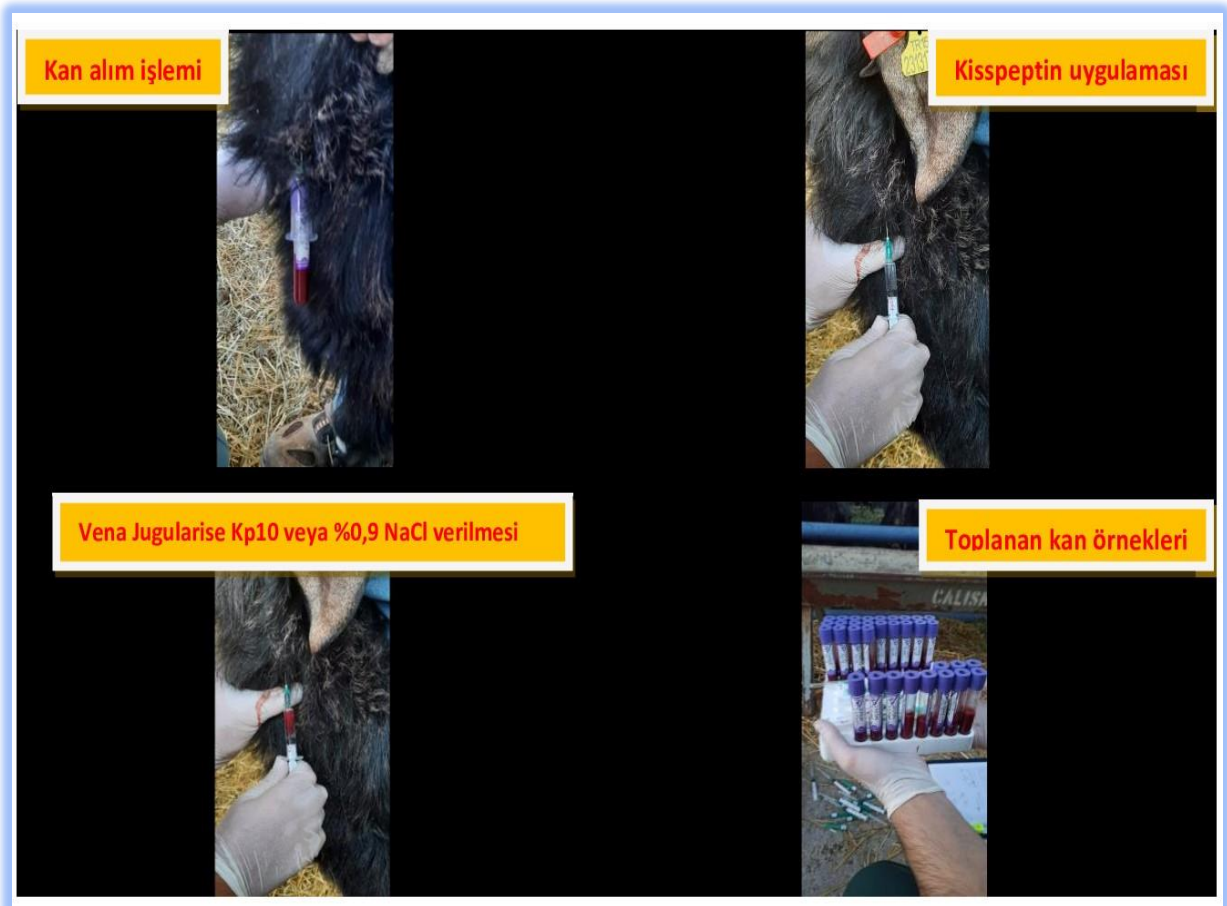
Resim 1. Araştırmada kullanılan aletler.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma Dizaynı

Çalışma tüm prepubertal oğlaklarda mevsimsel anöstrüsten üreme mevsimine geçiş döneminde Eylül ayının ikinci haftası başlatılmıştır. Uygulamanın başlatılmasından bir gün önce tüm hayvanların vücut ağırlıkları ölçülerek ve genel sistemik kontroller yapılmıştır.

I. Uygulama: Grup A ve Grup B'deki 5 aylık dişi oğlaklarda kisspeptinlerin pubertas üzerindeki etkinliğini incelemek amacıyla her iki gruba da intravenöz yolla 2µg/kg dozda (Tablo 4) birinci doz human kisspeptin 10 uygulanmıştır (Resim 2). Grup C'deki 5 aylık kontrol dişi oğlaklarına ise Grup A ve Grup B'den farklı olarak kisspeptin enjeksiyonu yerine plasebo amaçlı intravenöz yolla 1 ml serum fizyolojik tuzlu su (Tablo 4) uygulanmıştır.



Resim 2. Çalışma gruplarında gerçekleştirilen uygulamalar.

Tablo 4. Çalışma gruplarına intravenöz yolla yapılan uygulamalar

	Çalışma Grubu	OrtalamaVücut Ağırlığı (kg)	İ.V. Yolla 1. Doz Uygulamalar (5 aylık)	İ.V. Yolla 2. Doz Uygulamalar (7 aylık)
Grup-A	A1	27,5	40 µg+300 µl Kp – 10 human	40 µg+425 µl Kp – 10 human
	A2	27,9	40 µg+350 µl Kp – 10 human	40 µg+400 µl Kp – 10 human
	A3	26,5	40 µg+200 µl Kp – 10 human	40 µg+400 µl Kp – 10 human
	A4	26,1	40 µg+200 µl Kp – 10 human	40 µg+350 µl Kp – 10 human
	A5	25	40 µg+175 µl Kp – 10 human	40 µg+300 µl Kp – 10 human
	A6	31,7	40 µg+450 µl Kp – 10 human	40 µg+650 µl Kp – 10 human
	A7	36,5	40 µg+800 µl Kp – 10 human	40 µg+800 µl Kp – 10 human
	A8	20,3	40 µg Kp – 10 human	40 µg Kp – 10 human
	A9	22,3	40 µg+50 µl Kp – 10 human	40 µg+200 µl Kp – 10 human
	A10	33,8	40 µg+600 µl Kp – 10 human	40 µg+750 µl Kp – 10 human
Grup-B	B1	21,1	40 µg Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B2	21	40 µg Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B3	31	40 µg+400 µl Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B4	33,4	40 µg+550 µl Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B5	23,1	40 µg Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B6	22,2	40 µg Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B7	32,7	40 µg+500 µl Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B8	31	40 µg+500 µl Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B9	31,8	40 µg+500 µl Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	B10	27,3	40 µg+250 µl Kp – 10 human	Fizyolojik tuzlu su 1ml
Grup-C	C1	37,5	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C2	36,25	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C3	35,3	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C4	37,2	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C5	25	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C6	29,6	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C7	23,7	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C8	20	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C9	20,8	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml
	C10	34,6	Fizyolojik tuzlu su 1ml	Fizyolojik tuzlu su 1ml

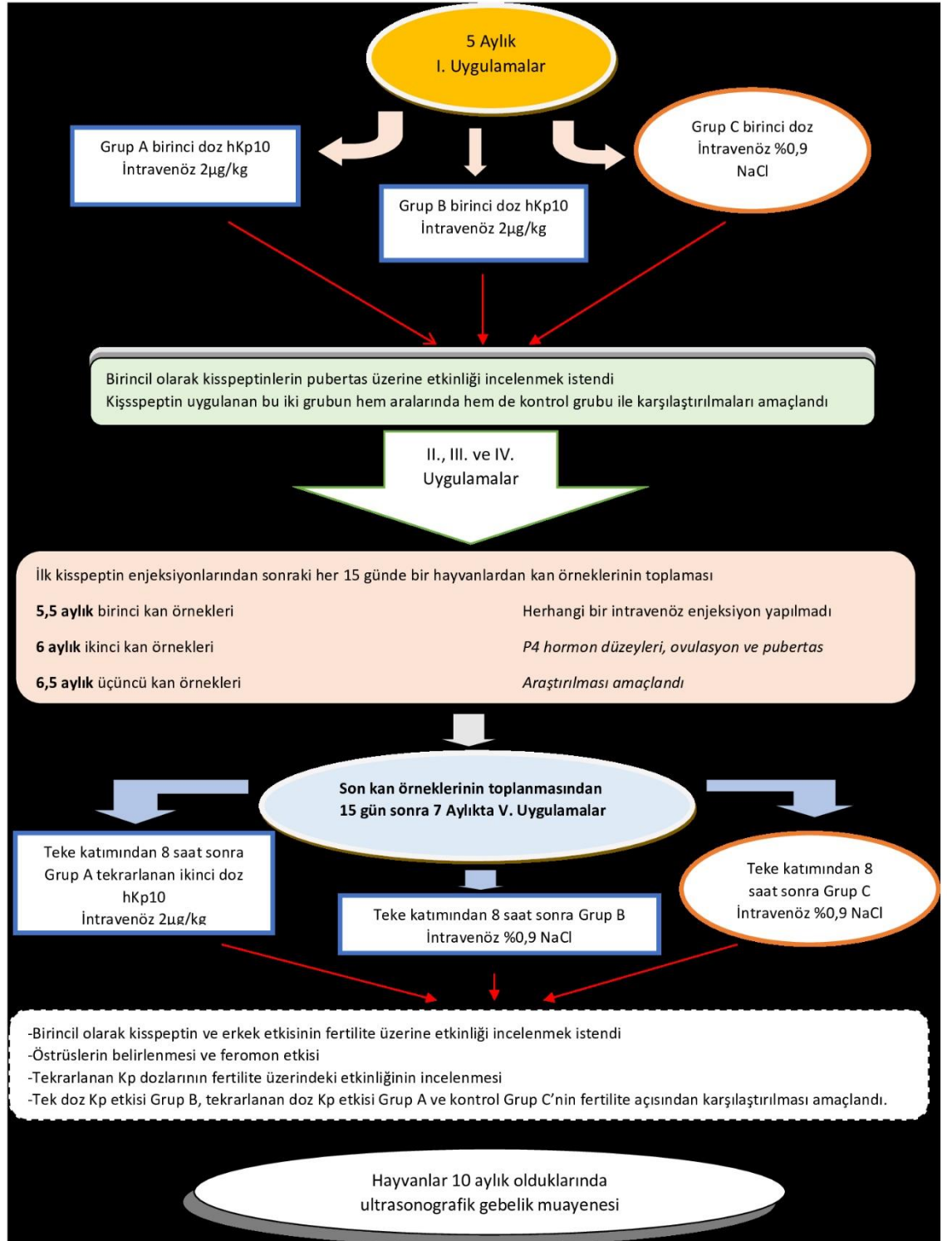
II. Uygulama: İlk uygulamalardan on beş gün sonra hayvanlar 5,5 aylık olduklarında human kisspeptin 10 peptidinin olası bir ovulasyon meydana getirip getirmediğini ve pubertal sürece geçişi sağlayıp sağlamadığını gruplar arasında karşılaştırmak amacıyla kan serumunda progesteron hormonu analizi için üç gruptan da yalnızca kan alımı yapılmıştır (Resim 2). Edtalı (K2) tüplerde hayvan başına yaklaşık 4-5 ml toplanan kan örneklerine (Resim 2) laboratuvar koşullarında 3000 devirde 8-9 dk. soğutmalı santrifüj uygulanmıştır. Elde edilen kan serumları mikrotüplere 2'şer ml alınarak progesteron düzeylerinin belirlenmesi amacıyla -18° C'de saklanmıştır.

III. Uygulama: İkinci uygulamadan on beş gün sonra hayvanlar 6 aylık olduklarında ikinci uygulamadaki işlem tekrarlanmıştır.

IV. Uygulama: Üçüncü uygulamadan on beş gün sonra hayvanlar 6,5 aylık olduklarında üçüncü uygulamadaki işlem tekrarlanmıştır.

V. Uygulama: Çalışmanın son uygulamasında 7 aylık dişi hayvanlarda hem östrüslerin belirlenmesi hem de feromon/erkek etkisinin fertilité üzerindeki etkinliğinin incelenmesi amacıyla 30 dişi hayvana ikinci doz uygulamalarından sekiz saat önce tecrübeli teke katımı yapılmıştır. Teke katımı yapıldıktan 8 saat sonra erkek etkisi ile beraber kisspeptinlerin fertilité üzerindeki tekrarlanan doz etkisini de incelemek amacıyla Grup A hayvanlarına intravenöz yolla 2µg/kg ikinci doz human kisspeptin 10 tekrarlanmıştır. Kisspeptinlerin fertilité üzerindeki tek doz ve tekrarlanan doz etkisinin araştırılması yönünden Grup A hayvanları ile karşılaştırmak amacıyla Grup B hayvanlarına ikinci doz human kisspeptin 10 uygulaması yerine plasebo amaçlı intravenöz yolla 1 ml serum fizyolojik tuzlu su uygulanmıştır. Kontrol grubuna tekrar ikinci doz olarak plasebo amaçlı 1 ml serum fizyolojik tuzlu su uygulanmıştır (Tablo 4).

Çalışmada hayvan materyallerine farklı yaşlarda ve zaman aralıklarında uygulanan enjeksiyonlar, hormon ölçümleri için farklı yaşlarda toplanan kan örnekleri, yapılan muayeneler ve tüm uygulamaların amaçları şematize edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. Çalışma boyunca yapılan uygulamalar, muayeneler ve çalışmanın amaçları.

3.2.2. Kisspeptin Sulandırma İşlemi ve Doz Ayarlaması

Kısa zincirli bir sekans olan Human kisspeptin 10 peptidinin [Kisspeptin-10 (Cat. No. 2570. Tocris Bioscience, U.S.A.)] 1 mg'ı 1ml apirojen su ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Çalışmamızdaki hayvan materyallerine uygulamak için toplamda 2 mg human kisspeptin 10 çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan 2 mg hKp10 sulandırmasına vorteks uygulandıktan sonra mikrotüplere tek uygulamalık olarak eklenmiştir. Tüm uygulamalar buz üzerinde soğuk zincir koşullarında gerçekleştirilmiştir (Resim 3).



Resim 3. Çalışmada kullanılan biyolojik ürün Tocris bioscience human kisspeptin 10 ve sulandırma işlemi.

İki miligram human kisspeptin 10 ürününün sulandırma işleminde kolaylık sağlamak amacıyla her bir oğlağın 20 kg olduğu varsayılarak her bir hayvana 40 mikrogram olacak şekilde mikrotüplere eklenmiştir. Yani 20 kg bir hayvan için her 1 (bir) mililitrelik mikrotüpte 40 mikrogram Kp-10 molekülü içeren sulandırma hazırlanmıştır. Sulandırmanın eklendiği mikrotüplere Kp-1, Kp-2, Kp-3'den başlayarak Kp-50'ye kadar olacak şekilde sırayla numaralandırma yapılarak dağılım gerçekleştirilmiştir. Böylelikle elimizdeki 2 mg human kisspeptin 10 peptidi 1 ml'lik 50 adet mikrotüpün her birine 40 mikrogram olacak şekilde dağıtılarak 2000 µg molekül kullanılmıştır. Hayvanlara vücut ağırlıklarına göre doz ayarlaması yapılırken özel bir hesaplama kullanılmıştır. 20 kg üzerinde olan hayvanlara mikrolitre düzeyinde sulandırma ilaveleri yapılarak uygun laboratuvar koşullarında hazırlanan dozlar hayvanların kulak küpe numaralarının da yazılarak belirtildiği 2 mililitrelik enjektörlere çekilerek hazırlanmıştır ve soğuk zincir altında taşınan enjektörlerdeki human kisspeptin 10 solüsyonları sahadaki çalışmanın birinci uygulamasında kullanılmıştır. Aynı doz ayarlaması çalışmanın beşinci uygulamasından birkaç saat önce A grubu hayvanlarına uygulamak için tekrarlanmıştır (Tablo 6).

Tablo 5. Vücut ağırlığına göre uygulanan kisspeptin doz hesaplaması

20 kg bir hayvan için her bir mililitrelik mikrotüpte 40 mikrogram Kp-10 molekülü içeren sulandırma hazırlandı.
Örnek 1: 26 kg bir hayvan için; $26-20 = 6$ kg için $(6 \text{ kg} \times 1000 \text{ µl}):20 \text{ kg} = 300 \text{ µl}$ ilave Sonuç: $40 \text{ µg} + 300 \text{ µl}$ hayvana uygulanan doz miktarı
Örnek 2: 31 kg bir hayvan için; $31-20 = 11$ kg için $(11 \times 1000 \text{ µl}):20 = 550 \text{ µl}$ ilave Sonuç: $40 \text{ µg} + 550 \text{ µl}$ hayvana uygulanan doz miktarı

3.2.3. Kan Serum Numunelerinde Progesteron Hormonu Ölçümü

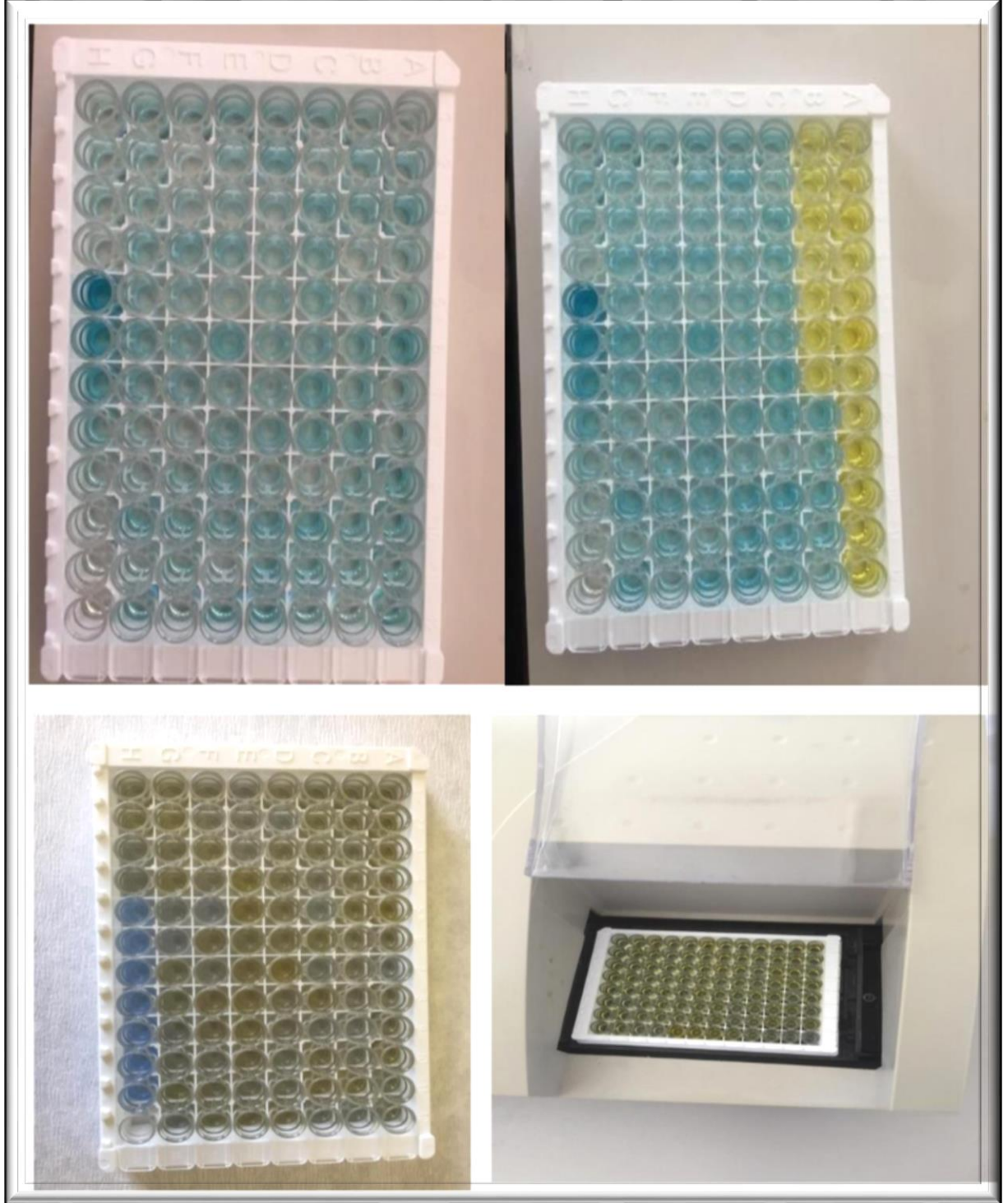
Çalışma boyunca prepubertal oğlakların pubertase ulaşp ulaşmadıklarını tespit etmek için ilk östrus ve ovulasyon sonrası oluşan corpus luteum tarafından salınan progesteron hormonunu tayin edebilmek amacıyla kan serumunda progesteron hormonu analizi yapılmıştır.

Kan serumunda progesteron hormonu düzeylerini belirlemek için BT LAB Goat Progesterone ELISA Kit (Cat.No: EA0005Go; sensitivite: 64 ng/ml; deteksiyon alanı: 0.2-60 ng/ml; serum ve plazma örneklerinde kullanımı uygun olan özelliklerde) doksan altı örneklik keçi progesteron Elisa test kiti kullanıldı (Resim 4). Hayvanlar 5.5, 6, 6.5 aylık olduklarında vena jugularisten kan örnekleri toplandı. Toplanmış olan ve -18°C' de saklanan 5.5, 6 ve 6.5 aylık hayvanlardan aldığımız kan serumu örneklerinin progesteron düzeylerini belirlemek amacıyla keçi spesifik progesteron ELISA test kiti kullanıldı ve sonuçlar elde edildi. Keçilerde pubertasa ulaşmada canlı ağırlığın, ırkın, mevsimin ve yaşın etkili olması nedeniyle ve optimal şartlarda bile 5-12 aylık yaşlarda pubertasa ulaşmaları nedeniyle 5.5, 6 ve 6.5 aylıkta progesteron hormon düzeyleri ölçülmüştür ve 5 aylıkken uygulanan kisspeptinlerin pubertas üzerine herhangi bir etkinliğinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak 5.5, 6 ve 6.5 aylık A, B ve C gruplarındaki 30 hayvana keçi progesteron Elisa test kiti uygulandı. 30 hayvandan elde edilen toplam 90 kan örneğinde serum progesteron düzeyleri Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında ölçüldü (Tablo 7, 8, 9).

3.2.3.1. Elisa Testinin Yapılışı

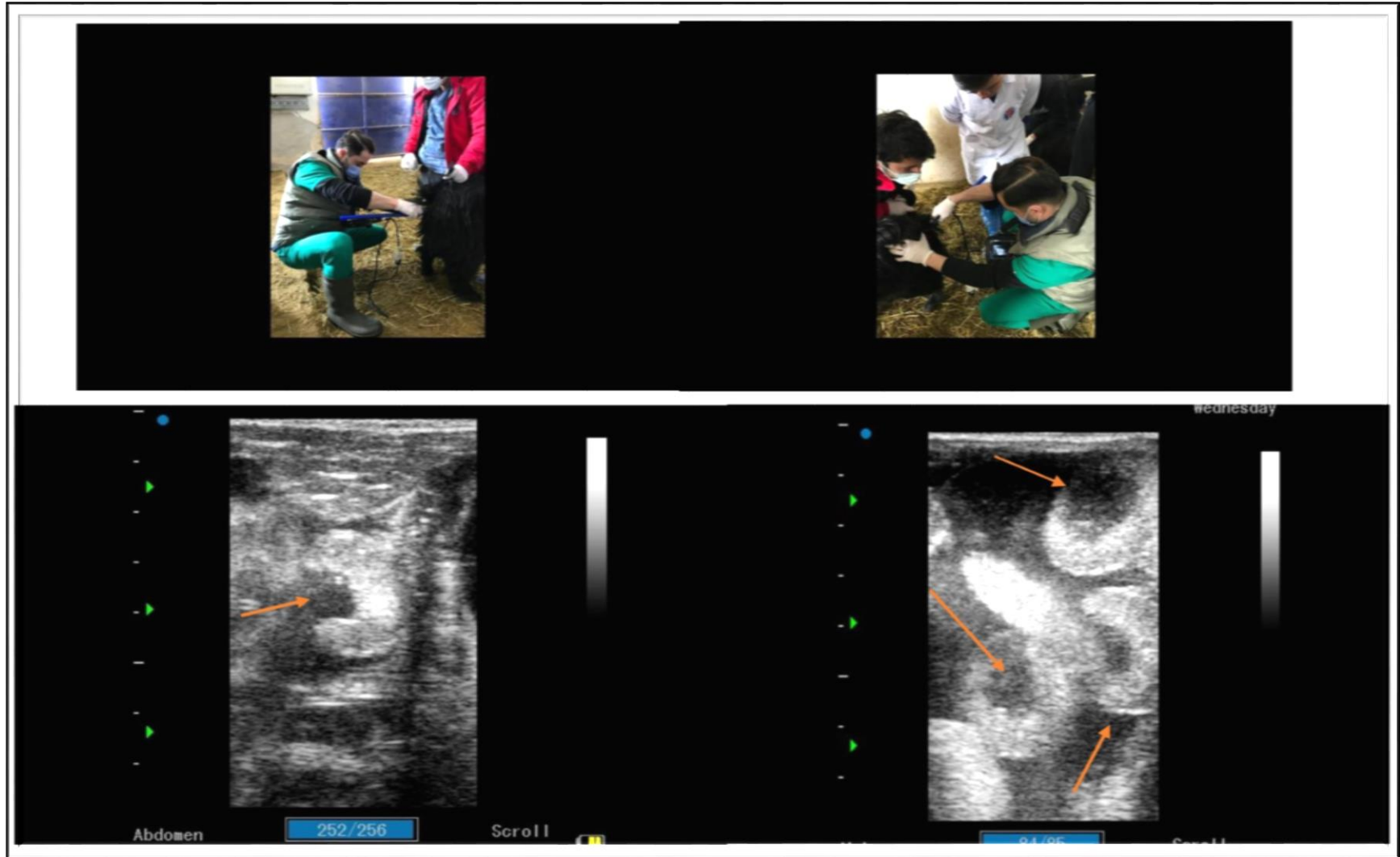
Elisa test kiti reaktifleri kullanımdan önce oda sıcaklığında bırakılmıştır ve test oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ölçümleri yapılacak olan kan serum örnekleri de 10-20 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2000-3000 devirde santrifüj edilerek serum örneklerinin sedimentsiz kısımları kullanılmıştır. Serum örnekleri 37°C'de 60 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra plakalarda aspirasyon ve beş kere buffer solüsyonu ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Boş plakalar haricinde tümüne avidin-HRP eklendikten sonra 37°C'de 60 dk inkübasyona bırakma işlemi tekrarlanmıştır. Sonrasında tekrar aspirasyon ve beş kere buffer solüsyonu ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Substrat solüsyonu ilave edildikten sonra koruyucu streç ile kaplanan plakalar karanlık ortamda 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonrasında her bir plakaya stop solüsyonu ilave edilmiştir. Plakalarda mavi rengin hemen sarı renge dönüşmesinden sonra optik dansiteyi (OD değeri) saptamak amacıyla mikropalak okuyucu ile sonuçlar hesaplanarak serum progesteron hormon düzeyleri belirlenmiştir (Resim 4).



Resim 4. Serum progesteron hormon ölçümü için keçi progesteron Elisa test kiti uygulaması (96'lık test kiti).

3.2.4. Ultrasonografik Gebelik Muayenesi

Çalışmada kullanılan hayvanlar 7 aylık olduklarında intravenöz enjeksiyonların uygulanmasından 8 saat önce hem östrüslerin belirlenmesi hem de erkek etkisini incelemek için dişi hayvanlara tecrübeli teke katımı yapılmıştı. Yedi aylıkken teke katımı yapıldıktan sonra da çalışmadaki dişi hayvanlar teke ile aynı ağılda tutuldu. Bundan 3 ay sonra çalışmadaki dişi hayvanlar 10 aylık olduklarında olası gebeliklerin tanısı için Real-Time B-mode ultrasonografi yardımıyla transrektal yolla hayvanların gebelikleri, yavruların kalp atımları ve plesantomları incelendi (Resim 5). Ultrasonografik gebelik muayenesi sonucunda gebelik durumu pozitif (+) ve negatif (-) olan dişi hayvanlar kayıt altına alındı.



Resim 5. Transrektal yolla real-time B-mode ultrasonografik gebelik muayenesi ve plesantomların görüntüleri.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

3.2.5.1. Progesteron Hormonunun Farklı Zamanlarda Gruplar Arası ve Grup İçerisindeki İstatistiksel Analizi

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla SPSS-22 (Statistical Packag for Social Sciences) programı kullanıldı (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Shapiro Wilk testi ile verilerin normal dağılıma uygunluğu değerlendirildi. Normal dağılım gösteren gruplar arası istatistiksel fark One Way ANOVA ile, normal dağılım göstermeyen gruplar arası istatistiksel fark ise Kruskall Wallis varyans analizi ile yapıldı. Farkların önem kontrolü post hoc Duncan testi ile, farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı (Conover, 1999). Yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan $p < 0,05$ olan değerler önemli kabul edildi. Tüm veriler ortalama ($\bar{X}$) $\pm$ standart hata (SH) olarak verildi.

3.2.5.2. Gebe Hayvan Sayısının Gruplar Arası İstatistiksel Analizi

Gebe hayvan sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi amacıyla “MINITAB 17” paket istatistik programı kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede veriler sayısal değerler olduğundan kıkare (χ^2) önemlilik testi kullanılmıştır. P değeri 0.05’ten küçük ise istatistiksel olarak “Anlamlı bir fark var” kabul edilmiş ve değerlendirilmiştir.

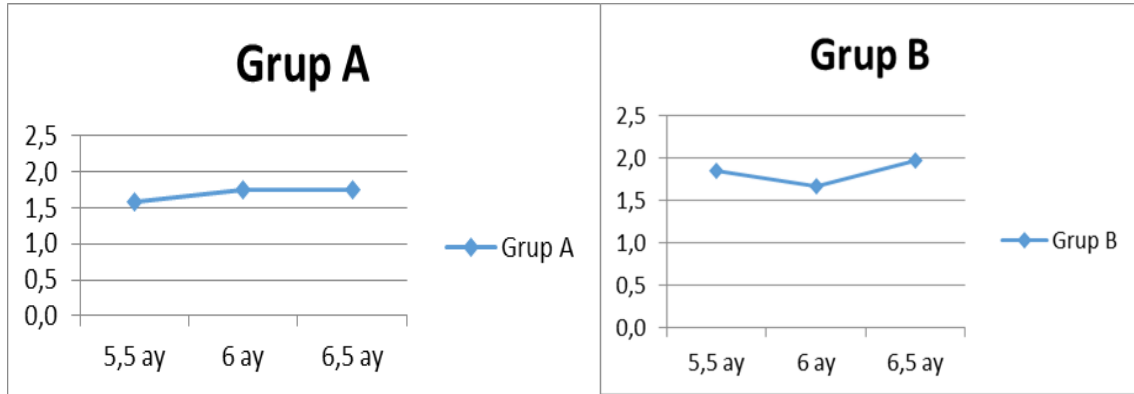
4. BULGULAR

4.1. Serum Progesteron Düzeyleri

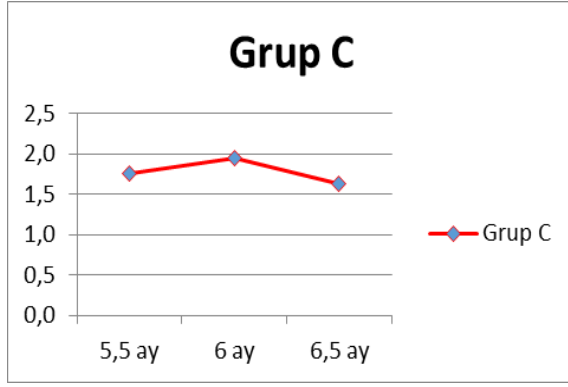
Araştırmada 5.5, 6, 6.5 aylık yaşlardaki dişi oğlaklardan toplanan kan serum örneklerinde ölçülen progesteron hormon düzeylerinin tüm gruplarda ≥ 1 ng /ml olduğu görülmüştür (Tablo 7, 8, 9).

Tablo 7, 8 ve 9'da gösterilen hayvanlara ait serum progesteron hormonu seviyesi ölçüm sonuçları içinde; maksimum ve minimum değerler uzaklaştırıldıktan sonra hayvanlarda yapılan progesteron ölçümünün gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bir P değeri ortaya koymadığı gözlenmiştir ($P > 0.05$; Tablo 6). Gruplar arasında üç farklı zamanda analiz edilen kan progesteron düzeyleri ortalamaları ($X \pm SH$) arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmamıştır. Fakat çalışma grubu olan A ve B grubunda progesteron hormon düzeylerinde artış ve devamlılık gözlenirken kontrol grubunda son ölçümde düşüş belirlenmiştir (Şekil 16).

Diğer yandan tablo 7, 8 ve 9'da hayvanlara ait serum progesteron hormon seviyelerine bakıldığında tüm gruplardaki hayvanlarda ≥ 1 ng /ml üzerindeki düzeyler pubertasa ulaşmış olabileceklerini göstermektedir.



Şekil 16. Kisspeptin uygulanan A ve B grupları ile fizyolojik tuzlu su verilen kontrol C grubundaki 5.5, 6, 6.5 aylık dişi oğlakların ortalama serum P4 düzeyleri (ng/ml).



Şekil 16. Devamı

Tablo 6. Progesteron hormon düzeylerinin gruplar arası istatistiki değerlendirmesi

Gruplar	Zaman			P
	5,5 ay	6 ay	6,5 ay	
A	1,641 ± 0,147	1,837 ± 0,325	1,823 ± 0,203 ^{a,b}	0,587
B	1,958 ± 0,298	1,974 ± 0,236	2,066 ± 0,065 ^a	0,573
C	1,597 ± 0,199	1,828 ± 0,156	1,533 ± 0,140 ^b	0,320
P değeri	0,643	0,898	0,053	

^{a, b}; Farklı harfler aynı sütunda istatistiksel anlamlı farklılığı göstermektedir.

Grup B ile Grup C arasındaki anlamlı fark p=0,05

Tablo 7. 5.5 aylık hayvanların serum progesteron hormonu ölçüm sonuçları

	Çalışma Grubu	Serum Progesteron Düzeyleri (ng\ml)
Grup-A	A1	1,1
	A2	1,4
	A3	1,3
	A4	1,9
	A5	1,3
	A6	1,7
	A7	1,8
	A8	1,0
	A9	1,2
	A10	2,7
Grup-B	B1	2,5
	B2	1,8
	B3	1,2
	B4	1,4
	B5	0,8
	B6	1,5
	B7	3,0
	B8	3,8
	B9	0,9
	B10	1,0
Grup-C	C1	1,3
	C2	1,4
	C3	2,5
	C4	2,2
	C5	1,8
	C6	0,9
	C7	1,2
	C8	1,4
	C9	3,2
	C10	1,3

Tablo 8. 6 aylık hayvanların serum progesteron hormonu ölçüm sonuçları

	Çalışma Grubu	Serum Progesteron Düzeyleri (ng\ml)
Grup-A	A1	0,9
	A2	0,9
	A3	1,0
	A4	1,2
	A5	1,1
	A6	4,4
	A7	2,1
	A8	1,2
	A9	1,9
	A10	2,2
Grup-B	B1	2,9
	B2	0,3
	B3	0,5
	B4	0,7
	B5	1,4
	B6	0,9
	B7	2,9
	B8	2,6
	B9	2,2
	B10	1,7
Grup-C	C1	1,7
	C2	2,4
	C3	2,6
	C4	1,2
	C5	1,3
	C6	1,4
	C7	2,2
	C8	1,3
	C9	1,9
	C10	2,9

Tablo 9. 6.5 aylık hayvanların serum progesteron hormonu ölçüm sonuçları

	Çalışma Grubu	Serum Progesteron Düzeyleri (ng\ml)
Grup-A	A1	2,1
	A2	1,1
	A3	1,4
	A4	1,5
	A5	1,1
	A6	1,5
	A7	2,2
	A8	1,0
	A9	3,3
	A10	1,8
Grup-B	B1	1,8
	B2	1,0
	B3	2,0
	B4	1,9
	B5	2,4
	B6	1,8
	B7	2,0
	B8	1,9
	B9	2,3
	B10	1,9
Grup-C	C1	1,8
	C2	1,3
	C3	2,2
	C4	1,2
	C5	1,9
	C6	2,5
	C7	1,2
	C8	0,7
	C9	1,7
	C10	1,4

4.2. Gruplardaki Gebelik Oranları

Çalışma gruplarındaki hayvanlar 10 aylık olduklarında transrektal yolla real-time B-mode ultrasonografi yöntemiyle yapılan gebelik muayenelerinde A grubundaki 10 (on) hayvandan beşinde plasentomların görüntülenmesi ile gebeliklerinin pozitif (+) olduğu ve Grup A hayvanlarında gebelik oranının %50 olduğu görülmüştür. Diğer yandan B grubunda yapılan gebelik muayeneleri sonucu 10 (on) hayvandan üçünde gebeliklerin pozitif olduğu ve Grup B hayvanlarında gebelik oranının %30 olduğu görülmüştür. Grup C hayvanlarında ise 10 (on) hayvandan birinde gebelik pozitif olduğu ve bu gruptaki gebelik oranının %10 olduğu gözlemlenmiştir. Gruplar arası gebelik oranı $A > B > C$ olarak sonuçlanmıştır (Tablo 11). Prepubertal dişi oğlaklarda kisspeptinlerin pubertas ve fertilité üzerine etkinliğinin incelenmesi amaçlanan bu tez çalışmasında gruplar arası gebelik sayıları üzerine yapılan istatistiksel incelemede ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ($P > 0.05$) bulunamamıştır (Tablo 10).

Tablo 10. Gebe hayvan sayılarının gruplar arası istatistiki değerlendirmesi.

Gruplar				P
	Pozitif (+)	Negatif (-)	Total	
A	5 1,333	5 0,571	10	P=0,149
B	3 0,000	7 0,000	10	
C	1 1,333	9 0,571	10	
Total	9	21	30	
Tüm gruplar için istatistiksel beklenen sayı	3	7	10	

Grup A, B ve C arasındaki anlamlı fark ($P > 0.05$).

Tablo 11. 10 aylık hayvanların trans-rektal yolla ultrasonografik gebelik muayenesi tanı sonuçları

	Çalışma Grubu	Gebelik Durumu (+) / (-)
Grup-A	A1	Negatif (-)
	A2	Pozitif (+)
	A3	Negatif (-)
	A4	Pozitif (+)
	A5	Negatif (-)
	A6	Negatif (-)
	A7	Pozitif (+)
	A8	Pozitif (+)
	A9	Negatif (-)
	A10	Pozitif (+)
Grup-B	B1	Negatif (-)
	B2	Negatif (-)
	B3	Negatif (-)
	B4	Pozitif (+)
	B5	Negatif (-)
	B6	Negatif (-)
	B7	Pozitif (+)
	B8	Pozitif (+)
	B9	Negatif (-)
	B10	Negatif (-)
Grup-C	C1	Negatif (-)
	C2	Pozitif (+)
	C3	Negatif (-)
	C4	Negatif (-)
	C5	Negatif (-)
	C6	Negatif (-)
	C7	Negatif (-)
	C8	Negatif (-)
	C9	Negatif (-)
	C10	Negatif (-)

4.3. Doğumlar

Gebelik süresi ortalama 150 günde tamamlanan keçilerde ultrasonografik gebelik muayenesi pozitif çıkan hayvanların tamamı normal gebelik süresi içinde doğumları gerçekleştirdi ve yalnızca bir hayvanda güç doğum meydana geldi. Grup A'daki gebe hayvanların hepsi de yavruları sağlıklı olarak doğurmuştur. Grup B' deki gebe hayvanlardan ikisi sağlıklı olarak yavru doğumlarını gerçekleştirmiştir fakat B7 numaralı hayvanın ikiz yavrularının bakıcı dikkatsizliği nedeniyle güç doğuma bağlı ölümleri gerçekleşmiştir. Kontrol grubundaki gebe hayvanın yavrusu sağlıklı olarak doğmuştur (Tablo 11).

4.4. Yavruların Doğum Ağırlığı

Yavruların doğumu gerçekleşir gerçekleşmez vücut ağırlıkları ölçüldü. Gruplar incelendiğinde doğan yavruların vücut ağırlıkları arasında değişkenlik görülmüştür. Çelik ve Olfaz (2018) kıl keçilerinde; doğan yavruların tekiz veya ikiz olmasına, erkek/dişi cinsiyetlerine bağlı olarak yavruların doğum ağırlığının değişkenlik gösterdiğini bildirmektedir. Doğum ağırlıkları; tekiz yavrularda 3.75 ± 0.05 , ikizlikte 3.19 ± 0.04 , erkek oğlaklarda 3.81 ± 0.07 , dişi oğlaklarda 3.46 ± 0.06 kg ve kıl keçisi oğlaklarında ortalama doğum ağırlıkları 3.72 ± 0.10 kg olarak belirtilmektedir (Çelik ve Oflaz; 2018). Bu bilgilere göre bir kısım yavrunun doğum ağırlığının ortalamaya yakın olduğu, bazılarının ortalama altında kaldığı ve özellikle A10 ile B7 numaralı hayvanların yavrularının doğum ağırlıklarının ortalamanın çok altında kaldığı görülmüştür (Tablo 11).

4.5. Tekiz ve İkiz Doğum

Gebe keçilerden yalnızca bir tanesi ikiz doğum yaptı ve yavruların güç doğuma bağlı ölümleri gerçekleşti. Diğer tüm hayvanlar tekli doğum gerçekleştirdi ve yavru ölümü gerçekleşmedi. Genel durumları takip edilen tekiz oğlakların sağlık durumlarının iyi olduğu görüldü. Doğan yavru sayıları kayıt altına alındı (Tablo 11).

4.6. Yavruların Cinsiyeti

Her iki cinsiyetten de yavru doğumu gerçekleşti. Yavruların yedisi dişi üçü ise erkek cinsiyetinde doğmuştur kayıt altına alınmıştır (Tablo 11).

4.7. Yavruların Doğum Aralıkları

Çalışmanın son aşaması olan 5. uygulamada yapılan ilk tecrübeli teke katımı ve sonrasında erkek ile bir arada tutulan çalışmaya dahil hayvanlar çiftleşme sonucu farklı zamanlarda gebe kalmaları nedeniyle doğum zamanlarında farklılıklar meydana gelmiştir ve kayıt altına alınmıştır. Yalnızca B4 numaralı hayvanın 5. uygulamada yapılan teke katımından önce bakıcı dikkatsizliği nedeniyle öncesinde bölgesini terk ettiği ve teke alanına geçtiği kaçak çiftleştiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla B4 numaralı gebe keçinin yavru doğumu çok daha erken olarak meydana gelmiştir. Grup B'deki B4 numaralı hayvanın ayrı tutuldukları ağıldan kaçtığı günlük olarak uyguladığımız hayvan sayımı ve kontrolü esnasında fark edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen diğer hiçbir hayvan 5. uygulamadan önce teke ile temas etmemiştir (Tablo 11).

Tablo 12. Doğum Kayıtları

Gebe Hayvan	Doğan Yavru Sayısı	Cinsiyet	Yavru Doğum Ağırlığı (Kg)	Doğum Zamanı	Yavruların Genel Durumu
A2	1	Dişi	2,49	26.04.2022	Sağlıklı
A4	1	Dişi	2,6	25.04.2022	Sağlıklı
A7	1	Erkek	3,3	08.05.2022	Sağlıklı
A8	1	Dişi	3,2	08.05.2022	Sağlıklı
A10	1	Dişi	2,1	20.06.2022	Sağlıklı
B4*	1	Erkek	4,5	26.03.2022	Sağlıklı
B7¶	2 (ikizlik)	Dişi/Dişi	2/2	10.05.2022	Her iki oğlak öldü
B8	1	Dişi	3	28.06.2022	Sağlıklı
C2	1	Erkek	3,6	10.05.2022	Sağlıklı

* Grup B'ye ait B4 numaralı hayvan, 7 aylıkken uygulanacak teke katımından önce çiftleşmiştir.

¶ Hayvan bakıcısı dikkatsizliği nedeniyle güç doğuma bağlı ölüm gerçekleşti.

5. TARTIŞMA

Pubertas genellikle dişilerin düzenli olarak ovulasyonlu ilk östrüs göstermeye başladığı zaman olarak tanımlanmaktadır (Foster, 1994).

Pubertasın, hipotalamik adenohipofizyal gonadal akstaki fizyolojik aktivasyonla karakterize ve reproduktif yeterlilikle sonuçlanan bir süreç olduğu bildirilmektedir. Diğer bir deyişle östradiol negatif feedback etkisinden çıkış ve yüksek frekanslı epizodik GnRH hormonu salınımı ile pubertasa ulaşılmaktadır (Amstelden ve diğerleri, 2011).

Pubertasa erişen hayvanlar ovulasyon yeteneği kazansa da hayvanlar seksüel açıdan henüz olgunlaşmamıştır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012).

Valasi ve diğerleri (2012) pubertası, fizyolojik, morfolojik ve davranışsal açıdan istenen reproduktif yeterliğe ulaşmaya kadar geçen aşamalı bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Küçük ruminantlarda pubertas başlangıcının cinsiyetler arasında farklılık gösterdiğini belirtmektedir. Bu farklılığın nedenini ise erken seksüel diferensiyasyonun steroid feedback sistemleri üzerindeki kontrolü ve böylece GnRH salınımindaki etkisi olarak bildirmektedirler. Pubertasın belirleyicisi olan genetik faktörler, endojen sinyaller, enerji dengesi ve çevresel faktörler gibi dinamik etkileşimler pubertasın zamanlanmasından sorumludur. Pubertas zamanlamasının ilk yavrulama yaşıyla beraber sonraki reproduktif hayatı ve küçük ruminantlarda verimliliği etkilediği de belirtilmektedir.

Yine Daniel ve diğerleri (2015)'ne göre ruminantlarda pubertas, östradiol tarafından LH hormonu üzerinde meydana getirilen negatif feedback baskısındaki bir düşüşle başlamaktadır.

Çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde özellikle de çalışmamıza dahil ettiğimiz keçi türü günümüz değişen iklim koşullarına uyum sağlayan en önemli türlerdendir. Keçi yetiştiriciliğinde döl, süt ve et veriminin önem taşıdığı, döl veriminin tüm diğer verimlerin temeli olduğu ve et verimini doğrudan etkilediği bildirilmektedir. Hayvanlar eşeyssel olgunluğa ulaşır ulaşmaz hemen damızlıkta kullanılmamaktadır. Damızlıkta kullanma yaşı daha ileri yaşlardır. Bu yüzden eşeyssel olgunluk yaşı ile ilk defa damızlıkta kullanma yaşı farklı kavramlardır. Damızlıkta ilk kullanma yaşı; hayvanların gelişimlerinde, verimlerinde ve konstitüsyonlarında önemli bir gerilemeye yol açmadan üreme için kullanılabilecekleri en erken yaş olarak tanımlanmaktadır. Genç hayvanların ırklarına göre ortalama ergin canlı

ağırlığın %70-75'ine ulaştıkları yaşta damızlıkta kullanılmaları uygun görülmektedir. Kültür ırklarında ise bu oran %60 civarına kadar düşebilmektedir. Damızlıkta ilk kullanma yaşı işletmenin verimliliğini etkilemektedir. Bu dönem damızlığa ayrılan genç hayvanların büyüme ve gelişme yönünden en verimsiz ve masraflı olduğu dönem olması nedeniyle bu dönem ne kadar kısa sürerse işletmenin hem gereksiz masraftan kurtulacağı hem de hayvanlardan elde edilecek verimlerle karlılığın artacağına dikkat çekilmektedir (Demir ve diğerleri, 2018).

Bir grup araştırmacı Sakız kuzularında ve Damaskus oğlaklarında yaptıkları çalışmada her iki tür için de fotoperiyodun (gün ışığı), koyun ve keçi türlerinin yanı sıra birçok memeli türlerinde mevsimsel reproduksiyonun kontrolünde primer faktör olduğunu belirtmektedir. Kuzulama ve oğlaklama zamanına bağlı olarak doğan kuzu ve oğlaklar doğum mevsimlerine göre farklı fotoperiyodik uyarımlara maruz kalmaktadır ve bu yüzden doğum mevsimine göre pubertas yaşları değişkenlik göstermektedir (Papachristoforou ve diğerleri, 2000). Keçilerde uygun yaş ve canlı ağırlığa ulaşıldıktan sonra mevsimin özellikle de bu tür hayvanlarda fotoperiyodun etkisi ile pubertasa ulaşılmaktadır. Ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede sonbaharda gün ışığının kısaldığı dönemde keçilerde üreme yani çiftleşme mevsimi başlamaktadır (Canoğlu ve Sarıbay, 2012). Aynı şekilde Demir ve diğerleri (2018) hem dişi hem de erkek oğlakların pubertas yaşlarına ulaşmalarında mevsimsel etkinin önemli bir faktör olduğunu ve östrus siklusu aktivitesinin başlangıcının genellikle gün uzunluğunun azalmaya başladığı mevsimde uyarıldığını, gün ışığının uzamaya başladığı dönemlerde ise sonlandığını belirtmektedir. Yine Delgadillo ve diğerleri (2007)'ne göre mevsimsel poliöstrik türler olan koyun ve keçilerin pubertas zamanı oğlak ve kuzuların doğum zamanı ile alakalıdır fakat doğum zamanı etkisi her iki cinsiyet için aynı değildir. Doğum zamanının pubertas üzerindeki etkisi dişi hayvanlarda erkeklere göre daha fazladır. Tez çalışmamızda fotoperiyot ve mevsim etkisinin gruplarda ve bireysel bazda farklılık oluşturmaması için aynı gün, aynı mevsimde uygulamalara başlanmıştır.

Dişi keçilerde ilk östrusun meydana gelmesi ile ulaşılan pubertas yaşı, hayvanların genetik yapısına, oğlaklama zamanına ve sürü yönetimine bağlı olarak yüksek oranda değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik 119 günlükten (Savana kahverengi keçisi, Güney Afrika orijinli, Güney Yarım Küre) 776 günlüğe kadar (Jamnapari keçisi; Angola-Nubian soyundan, Hindistan orijinli, Kuzey Yarım Küre) olan yaş aralığına yayılmaktadır. Yine Güney yarım kürede bulunan kuzeydoğu Brezilya gibi yarı kurak bölgelerdeki yerli keçi ırklarının pubertasa 363 günlükte ulaştığı bildirilmektedir (Freitas ve diğerleri, 2004). Ilıman bölgelerde üreme mevsimi sonbahar ve kış mevsimlerini kapsamaktadır ve mevsimsellikle beraber keçi

ırkı ve hayvanların bulundukları bölge lokasyonu farklılığı da üreme döneminin başlaması, üreme dönemi uzunluğu açısından önemli farklılıklar ortaya koymaktadır. Tropikal bölgelerde ise keçi türünün aralıksız üreme mevsimi süreci geçirdiği varsayılmaktadır (Fatet ve diğerleri, 2011). Ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede sonbaharda gün ışığının kısaldığı dönemde keçilerde üreme yani çiftleşme mevsimi başlamaktadır. Optimal çevre şartlarında koyun ve keçi türlerinde pubertas yaşının genel olarak 5-12 aylık sürece yayıldığı belirtilmektedir (Canoğlu ve Sarıbay, 2012). Yine Jainudeen ve diğerleri (2016) dişi keçilerde ilk ovulasyonla birlikte pubertasa 5-7 aylık yaşta, dişi koyunlarda ise 6-9 aylık yaşta ulaşıldığını belirtmektedir. Aynı zamanda bu araştırmacılar bazı koyun ve keçi ırklarının (Kıvırcık ve Merinos koyunları ile Ankara keçisi) ilk seksüel mevsimde pubertasa ulaşmada başarısız olduğunu ve pubertas yaşlarının 18-20 aya kadar çıktığını bildirmektedir. Sonuç olarak kuzey yarım kürede bulunan ülkemizdeki keçi ırkları güney yarım kürede bulunan ırklara göre tam tersi mevsimsel zamanlarda pubertasa ulaşmaktadır. Diğer taraftan ekvatorial bölgeye yakın olan ırklar daha erken yaşta pubertasa ulaşabilmektedir ve hatta aralıksız üreme mevsimi yaşamaktadır. Dünyadaki ırklarla ülkemizdeki ırkların pubertasa ulaşma yaşlarını karşılaştırdığımızda hemen hemen benzer değişken aralıklar gösterdiği görülmektedir. Keçi türünün pubertasa ulaşma yaşının bulundukları yarım kürenin mevsimsel döngüsüne, bulundukları bölge ve lokalizasyona, genetik yapılarına, ırka ve hatta bireyselliğe bağlı olarak çok fazla değişkenlik gösterdiği yine literatürler kapsamında belirtilmektedir. Çalışmamızı gerçekleştirdiğimiz yöresel keçi ırklarının ortalama pubertasa ulaşma yaşı ise 9-12 aylık yaş olup çalışmamız kapsamında kisspeptin uygulanan A ve B gruplarındaki ile kontrol C grubundaki 5.5. aylık hayvanların hemen hemen çoğunda $\geq 1 \text{ ng/ml}$ değerlerindeki serum P4 düzeyleri nedeniyle ovulasyon ve pubertasa ulaşmış olabilecekleri düşünülmektedir. Gruplar arasında kisspeptin uygulanan ve uygulanmayanlar arasında istatistiksel açıdan bir fark oluşmadığı görülmüştür. Grup A ve B’de kisspeptin uygulamasının pubertas üzerine etkinliği bu yüzden tam olarak anlaşılamamıştır. Hem kisspeptin uygulanan hem de kontrol grubunda ovulasyonun meydana gelmiş olabileceğini gösteren P4 değerleri nedeniyle tüm gruplardaki hayvanların kendiliğinden pubertasa ulaşmış olabilecekleri de düşünülmektedir. Ama 6 ve 6.5 aylıkken elde edilen serum P4 düzeylerine de bakıldığında A ve B grubunda artış ve devamlılık gözlenirken kontrol grubunda son ölçümde düşüş görülmesi kisspeptinlerin uygulanmasıyla luteal dönem üzerinde kalıcı bir etkinliğin oluşturabileceği ihtimalini ortaya koymaktadır.

Smith ve Clarke (2010) çalışmalarında son yılların gözde peptidi olan kisspeptinlerin koyunlarda pubertasa ulaşmada ve mevsimsel reproduksiyonda oldukça etkin olduğunu

belirtmektedir. Kumar ve diğerleri (2014) kisspeptinlerin reproduktif fonksiyondaki rolünün yaşamın erken dönemlerinde başladığını, ARC kisspeptin ile GnRH nöronları arasındaki nöronal devrelerin doğumdan önce işlevsel olduğunu ve embriyodan beri başlayan bu fonksiyon ile pubertasa geçişte de kisspeptinlerin bir kapı görevi gördüğünü bildirmektedir. Bu işlevselliğin varlığı üzerine ve reproduksiyon üzerindeki etki mekanizması küçük ruminant türlerinden genellikle koyunlarda çalışılmış olan kisspeptinlerin, fizyolojik mekanizma açısından benzer olan keçi ırklarında yapılan çalışmalarının çok kısıtlı düzeyde olması nedeniyle tez çalışmamızda reproduktif statü olarak prepubertal oğlaklarda kisspeptin uygulanarak pubertasa geçiş denenmiştir.

Keçilerde ve koyunlarda hipofizyal portal dolaşıma giren GnRH pulsatil salınımının folikulogenezis, spermatogenezis ve steroidogenezis için esansiyel olan gonadotropin sekresyonu ile LH ve FSH pulslarını oluşturmaktadır (Sarkar ve diğerleri, 1976; Neill ve diğerleri, 1977; Moenter ve diğerleri, 1991; 1992; Tanaka ve diğerleri, 1997). Kisspeptinler de hipotalama hipofizyal gonadal aksı yöneten, hipotalamusta lokalize olan gonadotropin salgılatıcı hormonunu indükleyen ve reproduktif nöroendokrinolojide önemli etkinlik gösteren peptidlerdir (Matsuda ve diğerleri, 2019). Keçi, koyun, inek gibi ruminantlarda ve primatlarda kisspeptinlerin bağlandığı kisspeptin nöronlarının anteriör hipotalamusun preoptik alanında ve mediobazal hipotalamusun arkuat çekirdeğinde olmak üzere iki hipotalamik bölgede lokalizasyonları bulunmaktadır (Estrada ve diğerleri, 2006; Hassaneen ve diğerleri, 2016). Smith ve diğerleri (2007) koyunlarda; Matsuyama ve diğerleri (2011) erkek keçilerde, Okhura ve diğerleri (2009b) yine erkek keçilerde kisspeptin nöron popülasyonlarının lokalize olduğunu belirtmektedir. Keçilerde erkek katımı etkisinde, üçüncü kisspeptin nöron popülasyonunun bulunduğu amygdala (beynin emosyonel hislere bağlı işlemleriyle alakalı primer bölgesi) medial nukleusundan (MeA) giren uyarıcı sinyallerin ARC kisspeptin nöronlarına geçişte rol oynadığı da bildirilmektedir (Sakamoto ve diğerleri, 2013; Beltramo ve diğerleri, 2020). Dolayısıyla keçi türünde kisspeptin nöron popülasyonlarının bulunması nedeniyle reproduktif statü açısından prepubertal dişi oğlaklarda kisspeptin uygulamasının pubertas ve fertilité üzerinde etkinliğinin olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca teke katımından sonra kisspeptinle alakalı değişkenlikleri anlamak için 7 aylık yaşta teke katımı yapılarak teke katımından 8 saat sonra A grubuna kisspeptin uygulanıp B grubuna ise uygulanmamıştır.

Sıçanlarda ve koyunlardaki çalışılmış olan Kp13 ve Kp16 izoformları aslında en etkili kısa zincirli kisspeptin izoformlarıdır (Caraty ve diğerleri, 2012). Ama Beltramo ve diğerleri (2020)'ne göre Kp sistemi hakkında elde edilen bilgilerin çoğu kısa form olan Kp10 izoformu

uygulanarak kazanılmıştır ve daha az derecede ise uzun form olan Kp54 izoformu kullanılmıştır. Kisspeptin 10 peptidinin kolay sentezlenen ve yüksek etkili bir izoform olduğu belirtilirken dezavantaj olarak çabuk indirgenerek atılması yani kısa ömürlü olduğu bildirilmektedir (Beltramo ve diğerleri, 2020). Gutierrez-Pascual ve diğerleri (2009)'ne göre kisspeptin 10 izoformunun sekansında gözlenen küçük değişimlerde işlevsel farklılıklar meydana getirmektedir. Leonardi ve diğerleri (2019) seksüel olgunluğa erişmiş melez Hereford düvelerinde sığır kisspeptin C terminal bölgesindeki sekansı ile özdeş yani sığır sekansla homolog olduğunu belirttiği diğer yandan Beltramo ve diğerleri (2020)'nin oKp10 peptidine yapısal olarak benzerlik gösterdiğini belirttiği mKp10 ile hKp10 peptidlerinin etkilerini karşılaştıran Leonardi ve diğerleri (2019) sekanslarında sadece son aminoasitleri farklı olan hem hKp10 hem de mKp10 peptidlerinin yüksek tek doz uygulamaları sonucunda hKp10 peptidinin plazma LH konsantrasyonlarında mKp10 peptidine göre daha belirgin bir etki yarattığını bildirmektedirler. Diğer yandan Caraty ve diğerleri (2007) hem hKp10 hem de oKp10 peptidlerinin koyunlara enjeksiyonu sonrası plazma LH ve FSH seviyelerinde bir artış olduğunu puls şiddetlerinde ve sürekliliğinde de benzerlik meydana geldiğini belirtmektedir Hashizume ve diğerleri (2010) ile Saito ve diğerleri (2012) yaptıkları deneysel çalışmalarda keçilerde uygulanan hKp10 peptidinin intravenöz enjeksiyonu sonucunda koyunlardakine benzer sonuçlar elde etmiştir. Beltramo ve diğerleri (2020) bir başka çalışmaya yaptıkları atıfta ise eKp10 peptidinin oKp10 peptidine benzerlik gösterdiği fakat eKp10 peptidinin oKp10 ve hKp10 peptidlerine göre daha az potansiyele sahip olduğunu bildirmektedir. İnsan ve koyun Kp10 peptidleri benzer potansiyele sahip olsalar da insan kisspeptin 10 daha etkindir ve eKp10 peptidi oKp10 ve hKp10 peptidlerine göre on kez daha az etkilidir. Kisspeptindeki tek bir amino asit modifikasyonu, kisspeptinlerin farklı türlerin reseptörleri üzerindeki aktive edici kapasitesini değiştirmektedir (Beltramo ve diğerleri, 2020). Bu yüzden sunulan tez çalışmamızda hem daha fazla çalışılmış olması ve hakkında daha fazla literatür bilgisi elde edilmesi, kısa zincirli olması özelliğiyle kolay sentezlenmesi ve ticari açıdan daha kolay bulunması, diğer sekanslarına göre GnRH/gonadotropinler üzerinde potansiyel etkinliğinin daha fazla olması, nedeniyle çalışma hayvanlarımızda human kisspeptin 10 kullanılmıştır.

Çiftlik hayvanlarında şimdiye kadar birtakım kisspeptin 10 deneysel çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve türlere göre sonuçları ortaya konmuştur.

Ezzat ve diğerleri (2009) Kp10 peptidinin 5 µg/kg tek doz şeklinde prepubertal dişi ve erkek buzağılara (Japon siyah buzağısı; 4-6 aylık) uygulanması sonucu FSH ve LH salınımını sağladığını, intravenöz (tek doz) Kp10 uygulamasında intramusküler (tek doz) uygulamaya

göre daha iyi cevap alındığını, erkek ve dişide Kp10 peptidine verilen cevabın farklı olduğunu belirtmektedir. Ezzat ve diğerleri (2009) her iki cinsiyette de FSH ve LH salınımını uyarıldığını fakat Kp10 peptidi uygulamasına 4-6 aylık prepubertal erkek buzağuların dişi buzağılara göre daha fazla cevap verdiğini belirtmektedir. Ezzat ve diğerleri (2009)'nin çalışması bizim tez çalışmamızla reprodüktif statü yani prepubertal dönemdeki farklı bir tür olan dişi oğlakların kullanılması, birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da etkinliğinin daha iyi olduğu belirlenen intravenöz yolla uygulama, tek doz ile tekrarlanan doz ve kısa zincirli Kp10 uygulanması yönünden benzerlik göstermektedir. Saito ve diğerleri (2012)'nin prepubertal (3 aylık) Shiba erkek oğlaklarda yaptıkları çalışmada 5 µg/kg tek doz i.v. yolla uygulanan Kp10 peptidi önemli derecede LH salınımını uyarmıştır. Bizim çalışmamızdaki farklar ise materyal sayımızı düşük tutmamıza rağmen yüksek maliyetleri nedeniyle 2 µg/kg olarak daha az dozda hKp10 kullanılmasıdır. Doz miktarı dezavantajı ile beraber kullanılan kisspeptinin pubertas üzerindeki etkinliğini ise serum progesteron hormonu ölçümü ile belirlemeye çalıştık. Tek doz ve tekrarlanan iki doz kisspeptin uyguladığımız B ve A gruplarında progesteron hormonlarında artışın devam ettiğini tespit ettik. Kontrol grubumuzda ise düşüş gözlemledik. Çalışmamızdaki bu durumu, Ezzat ve diğerleri (2009)'nin çalışmasında olduğu gibi kisspeptin uygulamasının GnRH/gonadotropin salınımının devamlılığını sağladığı bu devamlılık neticesinde düzenli bir seksüel siklusla ovulasyon ve dolayısıyla meydana gelen CL formunun salgıladığı artan bir progesteron hormon düzeyi oluşturduğu şeklinde düşünebiliriz.

Uygulanan kisspeptin dozu miktarları ile ilgili Whitlock ve diğerleri (2008) ovariectomize edilmiş ineklerde yaptıkları çalışmada i.v. yolla etkin olan kisspeptin dozunun üzerine çıktıklarında ve hatta ikinci bir tekrar doz uygulamasında bile uygulanan kisspeptinin LH şiddetinde ve LH hormonunun Kp10 peptidine cevap verme süresinde ayrıca bir etki göstermediğini belirtmektedir. Ayrıca Whitlock ve diğerleri (2008) ovariectomize edilmiş ineklerde, prepubertal buzağılara uygulanan dozun 1/20 miktarındaki bir doz uygulaması ile maksimum LH cevabını yakaladıklarını bildirmektedir. Yani tez çalışmamız açısından bakıldığında gonadotropinlerin salınımında, ovulasyon meydana gelmesinde ve pubertasa ulaşılması için prepubertal oğlaklarda etkin ideal kisspeptin dozunun kaç µg/kg olduğunu belirlemek amacıyla ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Yine prepubertal hayvanlarda reprodüktif statü açısından yetişkin hayvanlara uygulanandan çok daha fazla kisspeptin uygulaması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır. Etkin ve yüksek doz uygulamalarının önündeki en büyük kısıtlayıcı faktör ülkemiz şartlarında yine yüksek maliyetlerdir.

Caraty ve diğerleri (2007) i.v. yolla devamlı kisspeptin infüzyonunun uzun süreli LH/FSH salınımı sağladığını, devamlı kisspeptin infüzyonunun koyun türünde çok yoğun LH dalgası ve ovulasyon meydana getirdiğini, anöstrus dönem boyunca düşük dozdaki kisspeptin infüzyonunun asiklik dişi koyunlarda gonadotropin salınımını uyardığını ve ovulasyonu başlattığını belirtmektedir. Diğer taraftan Navarro ve diğerleri (2005) sıçanlarda in vivo olarak intraserebroventriküler yolla kisspeptin uyguladıklarında FSH cevabı oluşturmak için LH cevabı için uyguladıkları dozun yaklaşık 100 katı kadar dozda peptid verildiğini bildirmektedir. İntravenöz Kiss1 enjeksiyonu önemli derecede FSH salınımı sağlamaktadır. Caraty ve diğerleri (2007) çalışmalarında ise 6.2 nmol intravenöz hKp10 uygulamasının her iki gonadotropinde (LH/FSH) yarı yarıya maksimum cevap başlattığını ortaya koymaktadır. Caraty ve diğerleri (2007)'ne göre sıçanlarda ve koyunlarda yapılan bu iki çalışma arasındaki fark tür farklılığına, peptidin uygulama yoluna (intraserebroventriküler ve intravenöz) ve hayvanların fizyolojik yapısına bağlı olarak meydana gelmiştir. Yine Ezzat ve diğerleri (2009)'ne göre prepubertal buzağılarda aynı dozlarda intramuskuler yolla Kp uygulamasının intravenöz yolla uygulamaya göre daha düşük potansiyel ortaya koymaktadır. Bu ve benzer çalışmalar ışığında daha düşük maliyetle daha düşük dozlar kullanarak pubertas ve fertilité üzerinde etkinlik oluşturabilmek için tez çalışmamızda kullandığımız prepubertal oğlaklara human kisspeptin 10 peptidini daha etkin olduğu belirtilen intravenöz yolla uyguladık.

Kispeptinlerin uygulama yolu (intravenöz) yanısıra uygulama yöntemlerinin ve uygulanan doz miktarlarının de önemi çalışmalarla ortaya koyulmaktadır. Çalışmalarda belirtilenlere göre intravenöz yolla tek doz, tekrarlanan doz ve sürekli infüzyonla kisspeptin uygulama yöntemleri GnRH/gonadotropin salınımlarının sürelerinde farklılık oluşturduğu ve dolayısıyla ovulasyon meydana gelip gelmemesinde de rol oynadığı görülmektedir. Yine kisspeptin doz miktarları artırıldığında gonadotropinler daha fazla cevap oluşturmaktadır. Caraty ve diğerleri (2007) asiklik dişi koyunlarda kisspeptinin ovulasyon üzerindeki etkisini araştırmak için çalışma gruplarına i.v. yolla beş kere tekrarlanan dozda mKp10 uygulamaları sonrasında alınan kan örneklerinden plazma LH seviyelerini ölçtüklerinde tekrarlanan mKp10 enjeksiyonlarının plazma LH seviyeleri bakımından önemli derecede cevaplar oluşturduğunu fakat preovulator bir LH dalgası oluşturulmadığını görmüştür. Bu çalışma modeline benzer şekilde prepubertal dişi oğlaklara uyarladığımız tez çalışmamızda biz de A gurubuna i.v. yolla tekrarlanan iki doz farklı ve daha etkin olduğu bilinen hKp10, B gurubuna i.v. yolla tek doz hKp10 peptidi ve kontrol C gurubuna i.v. yolla fizyolojik tuzlu su uygulayıp toplanan kan örneklerinden serum progesteron hormonu seviyelerini ölçtüğümüzde kisspeptin uygulanan

gruplarda progesteron hormon düzeylerinde artışın devam ettiğini gördük. Yani çalışmamızda P4 düzeylerine göre ovulasyon meydana geldiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda ovulasyonun oluşmasını belki de Leonardi ve diğerleri (2019)'nin belirttiği gibi human kisspeptin 10 sekansının fare kisspeptin 10 sekansına göre daha etkin olmasına bağlayabiliriz. Diğer yandan Caraty ve diğerleri (2007) aynı özellikte hayvanlara sürekli infüzyonla mKp10 uyguladıklarında ise hayvanlarda ovulasyon meydana gelmiştir. Caraty ve diğerleri (2007)'ne göre devamlı kisspeptin infüzyonu uzun süreli LH/FSH salınımı sağlamaktadır, devamlı kisspeptin infüzyonunun koyun türünde çok yoğun LH dalgası ve ovulasyon meydana getirmektedir, mevsimsel anöstrüs boyunca düşük dozdaki kisspeptin infüzyonları asiklik dışı koyunlarda gonadotropin salınımını uyararak ve ovulasyonu başlatabilmektedir. Sebert ve diğerleri (2010) mevsimsel anöstrüsteki dişi koyunlara oKp10 peptidinin i.v. yolla sürekli infüzyonu sonucu yaklaşık infüzyondan 22 saat sonra iyi senkronize bir LH hormonu dalgası elde etmiştir ve infüzyon süresi azaldıkça LH hormonu dalgası oluşma oranlarının giderek azaldığını bildirmiştir. Sürekli infüzyon saha şartlarındaki zorluğu yanında pubertasa ulaşmada ve fertilité açısından tez çalışmamızda uygulanabilseydi daha etkin ve net sonuçlar elde edebileceğimizi düşünmekteyiz. Yine sürekli infüzyonla kullanılacak olan doz miktarının şu anki kullandığımızdan fazla olabileceği durumu maliyeti artırabilirdi. Ya da tez çalışmamızda kullandığımız dozları sürekli infüzyonla uygulayacak şekilde dozlara ayırma yöntemine başvurarak yani hayvan başına 2µg/kg dozu 48 saatte boyunca her saat başı daha küçük dozlarda uygulayarak pubertas ve fertilité açısından daha etkin sonuçlar alabilirdik. Ülkemiz yetiştiriciliğinde ve şartlarında bu uygulamanın zorluğu nedeniyle uygulamanın kusursuz yapılabilme durumu ise tartışmalıdır.

Kisspeptinlerin i.v. yolla sürekli infüzyonunun önemi bazı araştırmacılar tarafından kabul edilirken bunun aksine diğer bazı araştırmacı grupları Seminara ve diğerleri (2006) juvenil erkek hint al yanaklı maymunlarında yaptıkları çalışmaya göre ve Pampillo ve diğerleri (2009) kisspeptinlerin sürekli yani aralıksız uygulanmasının kisspeptin reseptörlerini duyarsızlaştırdığı belirtmektedir. Tez çalışmamızda tek doz ve tekrarlanan doz uygulama yöntemini tercih etme nedenlerimizden birisi de desensitizasyon meydana gelmesi ihtimalini göz önünde bulundurmamızdır. Ama sürekli infüzyonun yaratabileceği desensitizasyonun kaçınıcı saatlerde veya hangi doz miktarı sonucu oluşabileceğini ya da tez çalışmamızdaki uygulanan doz miktarları sürekli infüzyonla uygulandığında sürekli kisspeptin infüzyonunun kisspeptin reseptörlerinde desensitizasyon oluşturup oluşturmayacağı veya pubertas ve fertilité üzerinde daha etkin bir sonuç meydana getirip getirmeyeceği çalışılması gereken bir durumdur.

Kisspeptinlerde kullanılan doz miktarlarına göre reproduktif mekanizmada etkinlikleri üzerine çalışmaları incelediğimizde Hashizuma ve diğerleri (2010)'nin yaptıkları çalışmada i.v. yolla 1, 5, 10 µg/kg tek doz hKp10 uygulanan dişi keçiler (östrüs siklusunun luteal fazında) arasında plazma LH seviyelerinde önemli bir farklılık görülmemiştir. Ama 1, 5 ve 10 µg/kg tek doz hKp10 uygulanan hayvanlar serum fizyolojik tuzlu su uygulanan kontrol hayvanlarından çok daha iyi LH seviyeleri sergilemiştir. Benzer şekilde tez çalışmamızda 2µg/kg human Kp10 i.v. yolla iki doz uygulanan A grubu ve tek doz uygulanan B grubunda farklı olarak serum progesteron hormon artışı görülürken son ölçüm neticesinde A ve B gruplarındaki serum progesteron hormon artışının devam ettiği fakat kontrol C grubundaki hayvanlarda serum progesteron hormon seviyelerinde düşüş meydana geldiği görülmüştür. Hashizuma ve diğerleri (2010)'nin keçilerde uyguladıkları 5 ve 10 µg/kg hKp10 dozu tez çalışmamızdaki 2µg/kg hKp10 dozuna göre oldukça yüksek bir dozdur. Hashizuma ve diğerleri (2010) yüksek doz kullanmalarına rağmen sadece LH düzeylerindeki artışı belirtmiştir. Ovulasyon için gerekli olan bir preovulatör LH dalgası oluşturabilen LH salınımının meydana gelip gelmediğini bildirmemiştir. Tez çalışmamıza göre pubertasa ulaşılmasında ovulasyon meydana gelmesi önemli bir unsurdur ve bu yüzden progesteron değerlerinin devamlılığı istenmektedir. Hashizuma ve diğerleri (2010) kontrol grubu ile karşılaştırmaları sonucunda LH hormonu salınımındaki önemli artışın 1 µg/kg vücut ağırlığı dozdan daha fazla miktarda Kp-10 peptidi uygulandığında meydana gelebileceğini belirtmektedir. Yine destekleyen bir şekilde Arjmand ve diğerleri (2014) kisspeptin 10 peptidinin çok düşük dozlarının asiklik keçilerde LH salınımını artıramadığını bildirmektedir. Yani Arjmand ve diğerleri (2014)'ne göre i.v. yolla tek doz 1 µg/kg Kp10 uygulaması mevsimsel anöstrustaki Abadeh ekotip dişi keçilerinde LH salınımını uyarmamaktadır. Bu yüzden tez çalışmamızda kisspeptinin maliyeti de göz önüne alınarak 1 µg/kg dozdan daha fazla ve etkin olabileceğini düşündüğümüz hayvan başına 2µg/kg hKp10 peptidi uygulaması yapılmıştır. Yalnız önceden de literatürler ışığında belirttiğimiz üzere Hashizuma ve diğerleri (2010) ve Arjmand ve diğerleri (2014)'nin yetişkin keçilerde belirttiği dozlar bizim çalışmamız için düşük dozlardır. Han ve diğerleri (2005), Whitlock ve diğerleri (2008), Ezzat ve diğerleri (2009)'nin yaptıkları çalışmalara göre reproduktif açıdan yetişkin hayvanlara göre prepubertal hayvanlarda GnRH/gondotropinlerin salınımı üzerindeki baskının ortadan kaldırılması ve pubertas başlangıcı için çok daha fazla miktarda kisspeptin dozu uygulanması gerekmektedir. Buna rağmen tez çalışmamızdaki sonuçlara göre 2µg/kg doz kisspeptin uygulaması ile pubertas üzerinde etkinlik oluşturulabildiğini, hatta daha düzenli bir seksüel siklus meydana getirilebildiğini ifade edebiliriz.

Tez çalışmamızla neredeyse aynı prosedürlerin uygulandığı ilkbahar doğumlu prepubertal dişi kuzularda Redmond ve diğerleri (2011)'nin deneysel çalışmasında intravenöz yolla hayvan başına her saat başı 24 saat boyunca tekrarlanan 20 µg oKp10 dozu uygulanmıştır. Hayvan başına neredeyse 500 µg (0.5 mg) kisspeptin uygulanmıştır. Tez çalışmamızda hayvan başına kullandığımız dozlardan neredeyse 7-8 kat daha fazla doz kullanıldığı ve etkinliğinin hKp10 peptidinden daha düşük olduğu belirtilen oKp10 uygulandığı görülmektedir. Redmond ve diğerleri (2011) kullandıkları bu yüksek kisspeptin dozları ile çalışmanın başlatılmasından 5 gün sonra LH dalgası sonucu ovulasyon/foliküler luteinizasyona işaret eden 1ng/ml'nin üzerinde progesteron konsantrasyonları gözlemlemiştir ama ama luteal aktivitenin kısa süreli (2-3 gün) geliştiğini ve düzenli östrus siklusunun görüldüğü yaş bakımından bir ilerleme gösteremediklerini bildirmiştir. Tez çalışmamızda ilkbahar doğumlu prepubertal dişi oğlaklardaki deneysel çalışmamızda intravenöz yolla çok daha düşük olan 2µg/kg hKp10 dozu ile kisspeptin uyguladığımız gruplarımızda ovulasyon/foliküler luteinizasyona işaret eden 1ng/ml'nin üzerinde progesteron konsantrasyonları belirlenmiştir. Bununla beraber kisspeptin uygulanan gruplarımızda progesteron hormonu düzeylerinde zaman içerisinde artış ve devamlılık görülmüştür. Çalışmamızda da kisspeptin uygulanan gruplarda düzenli seksüel siklusların oluşturulabildiği ve gebelik oranlarına bakıldığında kalıcı CL formunun meydana gelebildiğini ve belki de damızlık yaşının daha erken yaşa çekilebildiğini söyleyebiliriz. Düşük doz uygulamamıza rağmen serum progesteron düzeylerinde Redmond ve diğerleri (2011) ile benzer sonuçları elde etmemizin nedeni daha güçlü potansiyele sahip bir sekans olan hKp10 kullanılmasına bağlayabiliriz.

Wang ve diğerleri (2012) prepubertal kuzularda intravenöz yolla daha da yüksek dozlar olan 0.5, 1, 2 mg hKp10 uygulaması sonucu 1 mg dozun üzerinde yapılan uygulamaların LH konsantrasyonları üzerinde istatistiki açıdan bir fark oluşturmadığını, pubertas ve fertilité üzerinde ilave bir etkinlik yaratmadığını belirtmektedir. Bu araştırmaya göre 1mg kisspeptin dozu pubertasa ulaşmada yeterli olabilecektir. Çalışmamızla kıyaslandığında aynı sekansların (hKp10) kullanıldığı görülmektedir. Bununla beraber farklı bir tür olan çalışmamızda kullanılan prepubertal oğlaklarda 1mg doz kisspeptin uygulamasının muhtemelen pubertas üzerinde daha güçlü bir etkinlik yaratacağı düşünülmektedir. Diğer yandan çalışmamızda A, B ve C gruplarının hepsinde de lüteinizasyona işaret eden progesteron hormon düzeylerinin belirlenmesi nedeniyle kisspeptinin pubertas üzerinde etkinliği tam olarak anlaşılamamıştır. Böyle yüksek kisspeptin dozlarının pubertas üzerinde ve pubertas sonrası fertilitéde çalışmamız sonuçlarından daha iyi sonuçlar meydana getirebileceği varsayılmaktadır.

Yine tez çalışmamıza göre kullanılandan daha fazla doz hKp10 peptidi daha küçük yaşlarda uygulanarak Saito ve diğerleri (2012)'nin prepubertal (3 aylık yaş, 8,6±0,9kg ortalama v.a) Shiba erkek oğlaklarında (yerli japon ırkı) yaptıkları çalışmada 5 µg/kg tek doz i.v. yolla uygulanan hKp10 peptidinin önemli derecede LH salınımını uyarmıştır. Çalışmalara göre prepubertal hayvanlarda post pubertal hayvanlara göre daha fazla kisspeptin dozuna ihtiyaç duyulduğu ve kisspeptine verilen LH cevabının yine prepubertal aşamada pubertas sonrası reproduktif statüye göre daha fazla olduğu bilinmektedir. Ezzat ve diğerleri (2009) farklı bir türde benzer bir uygulamalarında Kp10 peptidinin i.v. yolla 5 µg/kg tek doz şeklinde prepubertal dişi ve erkek buzağılara (Japon siyah buzağısı; 4-6 aylık yaşta) uygulanması sonucu FSH ve LH salınımını sağladığını ve cinsiyet olarak erkek buzağılarda oluşan LH cevabının daha fazla meydana geldiğini bildirmektedirler. Wang ve diğerlerinin (2012) prepubertal dişi kuzulardaki (1mg kisspeptin uygulaması) çalışmasına da bakıldığında özellikle büyük ve küçük ruminant türlerine göre pubertas yaşına ulaşmada yeterli vücut ağırlığının çok altında kondüsyona sahip olan hayvanlara erkek ve dişi cinsiyet farketmeksizin yüksek dozlarda kisspeptin uygulanması yani ilk ovulasyonlu östrüs oluşması açısından ve reproduktif aksın gonadotropinler üzerindeki güçlü inhibe edici baskısını ortadan kaldırmak için hormonal mekanizmanın daha güçlü nöronal sinyallerle tetiklenmesi gerektiği, aynı tür ve yaşlardaki hayvanlara aynı dozda kisspeptin uygulaması halinde erkeklerde daha başarılı reproduktif sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu durumda tez çalışmamızda uyguladığımız kisspeptin dozunu bu çalışmalarla karşılaştırdığımızda prepubertal dişi oğlakların pubertasları üzerinde etkin sonuçlar elde edebilmek için 2 µg/kg dozun oldukça düşük bir doz olduğunu söyleyebiliriz. Cinsiyetler arasındaki kisspeptinlere verilen cevaplardaki farklılığı anlayabilmek ve prepubertal dişi hayvanlarda daha etkin dozların belirlenmesi için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Decourt ve diğerleri (2016) kisspeptin 10 peptidinden daha uzun ömürlü ve koyunlarda intramusküler enjeksiyonda (15nmol/koyun) başarılı sonuçlar veren compound 6 (C6) adında bir Kp10 analogunun FSH, LH ve progesteron hormonu üzerindeki etkisini hem üreme mevsimindeki hem üreme mevsimi dışındaki dişi koyunlarda ayrı ayrı incelemiştir. Bir kisspeptin analogu olan C6 koyunlarda hem üreme mevsiminde hem de mevsimsel anöstrüste östrüs davranışlarını başlatmış, gebeliklerin oluşması ve sağlıklı kuzu doğumlarına bağlı olarak iyi oosit kalitesi oluşturduğu ve kaliteli fertil ovulasyonların meydana getirdiği görülmüştür. Mevsimsel anöstrüsteki dişi koyunlara Kp10 (15nmol/koyun) ve C6'nın (15nmol/koyun) intramusküler yolla uygulamaları ile tez çalışmamızda prepubertal oğlaklara intravenöz Kp10

(2 µg/kg) uygulaması karşılaştırıldığında saha şartlarında C6'nın intramuskuler uygulama yolu kolaylığı öne çıkmaktadır. Diğer yandan C6'nın uzun ömürlü olması nedeniyle tez çalışmamızda intravenöz yolla uygulanan Kp10'a benzer GnRH/gonadotropin uyarımı sağladığı görülmektedir. Kisspeptin 10'un FSH/LH hormonlarını kısa ve ani uyarımından gonadotropin konsantrasyonlarının hızlı bir şekilde başlangıç düzeylerine geri dönmesi nedeniyle Kp 10 dezavantaj oluşturmaktadır. Compound 6'nın uzun süreli LH konsantrasyonlarını koruması nedeniyle intravenöz Kp10 uyguladığımız tez çalışmamızda olduğu gibi Decourt ve diğerleri (2016)'nin çalışmasında da hayvanlarda serum progesteron hormon seviyelerindeki artışın korunduğu dolayısıyla ovulasyon ve sonrasında kalıcı CL yapısının oluştuğu görülmüştür. Ama Kp 10'un intramuskuler uygulanması sonucu çalışma hayvanlarında ovulasyon meydana gelmemiştir. Bu da tekrar intravenöz uygulamanın daha etkin olduğunu gösterirken, C6'nın ise intramuskuler yolla tez çalışmamızla benzer etkinlik oluşturması daha üstün potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Tez çalışmamızla benzer olarak Decourt ve diğerleri (2016) çiftleştirme sonrası çalışmadaki 10 hayvandan yedisinin gebe kaldıklarını gösteren kalıcı progesteron düzeyleri ile aynı zamanda transrektal ultrasonografik gebelik muayenesi sonucu canlı fetüslerin görülmesi ve sonuç olarak ta sağlıklı kuzuların doğumu ile C6'nın fertilité üzerinde etkinliğini ispatlamışlardır. Tez çalışmamızda ise teke katımı ile beraber çiftleştirme sonucu hem erkek etkisi hem de tekrarlanan iki doz Kp etkisi ile A grubunda 10 hayvandan beşinin gebe kaldıklarını gösteren kalıcı progesteron düzeylerinin belirlenmesi, transrektal ultrasonografik gebelik muayenesi sonucu plasenteomların görülmesi ve sonuç olarak ta sağlıklı oğlakların doğumu ile human kisspeptin 10 uygulamasıyla compound 6'ya yakın bir başarı elde ettiğimizi düşünmekteyiz. Bir diğer Kp uyguladığımız B grubunda ise yine teke katımı yapılmış olmasına rağmen muhtemelen tek doz hKp10 uygulanması nedeniyle gruptaki 10 hayvandan üçünde gebelik belirlenmesi sonucu B grubunda gebe hayvan sayısı Decourt ve diğerleri (2016)'ne göre daha düşük kalmıştır. Decourt ve diğerleri (2016)'nin tek doz intramuskuler yolla potansiyeli daha güçlü olan C6 kullanımı sonucu elde ettikleri gebelik sayıları ile karşılaştırdığımızda tez çalışmamızdaki A grubunda sayısal anlamda gebelikte yakın başarı elde etmemizi Kp 10 peptidini intravenöz ve tekrarlanan iki doz uygulamamız ile ilişkilendirebiliriz.

Decourt ve diğerleri (2019) dişi keçilerde ovulasyonu başlatmak amacıyla klasik protokol olarak uygulanan progesteron ile kombine edilen PMSG hormonu uygulamasına alternatif olarak C6' nın etkinliğini ortaya koymak için dişi koyunlarda yaptıkları çalışmaya benzer prosedürler uygulamıştır. Dişi keçilere tek doz (15nmol/keçi) intramuskuler C6 enjeksiyonu

sonrası hem LH hem de FSH salınımı gerçekleşmiştir. Gonadotropinlerin salınımını takiben tez çalışmamızda olduğu gibi ovulasyonu ve CL formunun meydana geldiğini artışı korunan progesteron düzeyleri elde edilmiştir. Çalışma hayvanlarına uygulanan suni tohumlamadan 21 gün sonra hem C6 grubundaki 11 hayvanın yedisinde hem de PMSG grubundaki 11 hayvanın sekizinde plazma progesteron düzeylerinde artış görülmüştür. Doğumlarla belirlenen gebelik sayıları ise C6 grubundaki dişi keçilerde 11 hayvandan beşi, PMSG grubundaki dişi keçilerde 11 hayvandan yedisi belirlenmiştir. Tez çalışmamızla karşılaştırıldığında hKp10 ile A grubunda elde ettiğimiz 10 hayvandan beş gebelik sayısı Decourt ve diğerleri (2019)'nin C6 ile elde ettiği gebelik sayısı ile örtüşmektedir. Coumpound 6'nın human kisspeptin 10'a göre daha yüksek potansiyele sahip olmasına rağmen tez çalışmamızda benzer gebelik sayısı elde etmemizi uygulama yolu olarak intravenöz yol ve tekrarlanan iki doz uygulamalarını tercih etmemiz ve teke katımı ile erkek etkisi oluşturmamızla ilişkilendirebiliriz. Human kisspeptin 10 etkinliğini belki de tekrarlanan iki doz intravenöz uygulama ve erkek etkisi ile güçlendirmiş olabiliriz. Çünkü aynı protokollerin uygulandığı koç katımının yapıldığı Decourt ve diğerleri (2016)'nin çalışmasında 10 hayvandan yedisi gebe kalmıştır. Decourt ve diğerleri (2019)'nin çalışmasında ise suni tohumlama sonucu 11 hayvandan beşi gebe kalmıştır. Tez çalışmamızda ise teke katımı sonucu 10 hayvandan beşi gebe kalmıştır.

Decourt ve diğerleri (2016)'nin ile Decourt ve diğerleri (2019)'nin çalışmalarında ve tez çalışmamızdaki sonuçlara göre kisspeptin 10 ve C6 ortak potansiyel etkinliğinin daha çok lüteal dönem üzerine olduğunu düşünmekteyiz.

Tez çalışmamızda gruplar arası yaptığımız gebelik oranı istatistiksel sonucuna göre anlamlı bir fark bulunamamış olsa da sayısal değer olarak C6 ile yapılan çalışmaların ortaya koyduğu sonuçlara benzer sonuçlar ve C6'nın etkisine benzer bir potansiyel elde ettiğimizi ileri sürebiliriz.

Yapılan çalışmalar ve incelenen literatürler ışığında kisspeptinlerin izoformlarına bağlı, bazı çalışmalarda ve tez çalışmamızda da kullanılan kısa izoformlardan birisi olan Kp10 peptidinin özellikle türe, reproduktif statüye, uygulama yoluna, uygulanan doz miktarına, Kp10 sekanslarına ve hatta tür içinde cinsiyete göre HPG aksta ve GnRH/FSH/LH üzerinde farklı etki mekanizmaları meydana getirdiği görülmektedir. Küçük ruminantlarda kisspeptin 10 ile alınabilecek en etkin sonuçların uygulama yolu (intramusküler, intravenöz, intraserebroventriküler), uygulama süreleri (tek doz, tekrarlanan doz veya sürekli infüzyon) ve uygulanan doz miktarına bağlı olduğu görülmektedir. Dolayısıyla kisspeptin 10 peptidinin

pubertas ve fertilite üzerine olan etkinliğinin daha net belirlenebilmesi için gelecek çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prepubertal dişi oğlakların pubertasa ulaşma yaşları ve fertiliteleri üzerinde kisspeptin molekülünün (human Kp10; hKp10) etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen tez çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların başka araştırmacıların deneysel çalışmaları ile karşılaştırılması sonucunda;

- Tez çalışmamızda human kisspeptin 10 peptidinin sınırlı sayıda hayvan materyalına uygulanmış olması nedeniyle 2 µg/kg kisspeptin dozunun pubertas üzerine etkinliğinin yetersiz olabileceği,
- Human kisspeptin 10 peptidinin kullanılan 2 µg/kg dozunun çalışmamız kapsamında daha çok lüteal dönem üzerindeki etkinliği görülmüş olup, kisspeptin uyguladığımız hayvanlarda kalıcı CL formları oluşturulabileceği ve artışı devamlılık gösteren progesteron hormon seviyelerinin sağlanabileceği,
- Pubertas üzerinde etkinliği tam olarak belirlenememiş olan 2 µg/kg human kisspeptin 10 dozunun intravenöz yolla, tekrarlanan doz uygulaması ve erkek etkisiyle kombine edilmesiyle fertilité üzerinde önemli başarı sağlayabileceği,
- Etkin uygulama yolu, dozu ve uygulama süresi seçildiğinde human kisspeptin 10 peptidinin fertilité üzerinde potansiyel gücü daha fazla olan diğer bazı analoglar kadar başarı yaratabileceği,
- Tez çalışmamızda kullanılan mevsimsel poliöstrik prepubertal oğlakların pubertaslarının zamanlanması için çeşitli çalışmalarla artan dozdaki kisspeptin uygulamaları ile etkin optimal dozların ortaya koyulabileceği,

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçların human kisspeptin 10'un, diğer farklı kisspeptin izoformlarının veya analogların intravenöz yolla sürekli infüzyonu, daha yüksek dozları farklı zamanlarda (yaş) kullanılarak yapılacak ilave deneysel çalışmalarla kisspeptinlerin pubertas ve fertilité üzerindeki etkinliğinin daha kayda değer seviyelere çıkarılabileceği düşünülmektedir ve bu gelecek çalışmalar konunun daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Kisspeptinlerin özellikle de keçi türü hayvanlarda intravenöz yolla

tekrarlanan doz ve sürekli infüzyon uygulamasının saha şartlarında zorluğu unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., ...Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *Journal of Reproduction and Development*, 53, 367–378. doi: 10.1262/jrd.18146

Alaçam, E. (2002). *Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite*. Ankara: Medisan Basımevi.

Amstalden, M., Alves, BRC., Liu, S., Cardoso, RC., Williams, GL. (2011). Neuroendocrine pathways mediating nutritional acceleration of puberty: insights from ruminant models. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 109. doi: 10.3389/fendo.2011.00109

An, X., Ma, T., Hou, J., Fang, F., Han, P., Yan, Y., ...Cao, B. (2013). Association analysis between variants in KISS1 gene and litter size in goats. *BMC Genetics*, 14, 63.

Arjmand, M., Mirzaei, A., Reza, M., Shirazi, J., Tamadon, A., Salehi, MS., ... Dvm, Amin, T. (2014). Luteal activity of Abadeh ecotype does in summer and winter and the effect of kisspeptin-10 on luteinizing hormone secretion in the anestrus does. *Veterinary Research Forum*, 5(4), 247.

Arthur, GH. (2008). *Puberty, Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* (8. bs., ss. 3-4). London: Saunders Basımevi.

Bedenbaugh, MN., D'Oliveira, M., Cardoso, RC., Hileman, SM., Williams, GL., Amstalden, M. (2018). Pubertal escape from estradiol negative feedback in Ewe lambs is not accounted for by decreased ESR1 mRNA or protein in kisspeptin neurons. *Endocrinology*, 159, 426–38. doi: 10.1210/EN.2017-00593

Bedenbaugh, M. N., O'Connell, R. C., Lopez, J. A., McCosh, R. B., Goodman, R. L., Hileman, S. M. (2018). Kisspeptin, gonadotrophin-releasing hormone and oestrogen receptor α colocalise with neuronal nitric oxide synthase neurones in prepubertal female sheep. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(1), e12560. doi: 10.1111/JNE.12560

Bellefontaine, N., Hanchate, NK., Parkash, J., Campagne, C., de Seranno, S., Clasadonte, J., ... Prevot, V. (2011). Nitric oxide as key mediator of neuron-to-neuron and endothelia-to-glia communication involved in the neuroendocrine control of reproduction. *Neuroendocrinology*, 93(2), 74–89. doi: 10.1159/000324147

Beltramo, M., Robert, V., Decourt, C. (2020). The kisspeptin system in domestic animals: what we know and what we still need to understand of its role in reproduction. *Domestic Animal Endocrinology*, 73, 106466. doi: 10.1016/j.domaniend.2020.106466

Canoğlu, E. ve Sarıbay, M.K. (2012). Üreme fizyolojisi. A. Semacan, M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rişvanlı, A. Köker (Eds), *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji: Üreme kanalının morfolojisi ve üreme fizyolojisi* içinde (1. bs., ss. 534-548). Ankara: Medipres Basımevi.

Caraty, A., Locatelli, A., Martin, GB. (1989). Biphasic response in the secretion of gonadotrophin releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *Journal of Endocrinology*, 123, 375–82. doi: 10.1677/joe.0.1230375

Caraty, A., Smith, JT., Lomet, D., Ben, S., Morrissey, A., Cognie, J., ... Clarke, IJ. (2007). Kisspeptin Synchronizes Preovulatory Surges in Cyclical Ewes and Causes Ovulation in Seasonally Acyclic Ewes. *Endocrinology*, 148(11), 5258–5267. doi: 10.1210/en.2007-0554

Caraty, A., Leprince, J., Lomet, LD., Lefranc, B., Bourmaud, A., Sebert, ME., ... Vaudry, H. (2012). *Kisspeptin isoforms in the hypothalamus: What new* [kisspeptin signaling in the brain]. 2nd World Conference, Neuroendocrinologie Marseille, FRA, Tokyo, Japonya.

Caraty, A., Lomet, D., Ebert, MES., Guillaume, D., Beltramo, M., Evans, NP., ... Evans, N. (2013). Gonadotrophin releasing hormone release into the hypophyseal portal blood of the ewe mirrors both pulsatile and continuous intravenous infusion of kisspeptin: An insight into kisspeptin's mechanism of action. *Journal of Neuroendocrinology*, 25, 537-546. doi: 10.1111/jne.12030

Castellano, J., Navarro, V., Fernandez-Fernandez, R., Castano, J., Malagon, M., Aguilar, E., ... Tena-Sempere, M. (2006). Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin releasing hormone system of the rat. *Mol. Cell. Endocrinol*, 257, 75-83. doi: 10.1016/j.mce.2006.07.002

Chalivoix, S., Bagnolini, A., Caraty, A., Cognie, J., Malpaux, B., Dufourny, L. (2010). Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the Ewe diencephalon in connection with reproductive function. *Journal of Neuroendocrinology*, 22, 110–8. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01939.x

Clarke, SA. ve Dhillon, WS. (2016). Kisspeptin across the human lifespan evidence from animal studies and beyond. *Journal of Endocrinology*, 229, 83–98. doi: 10.1530/JOE-15-0538

Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, WH., Caraty, A., Herbison, AE. (2009). Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 673–82. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x

Clarkson, J., Boon, WC., Simpson, ER., Herbison, AE. (2009). Postnatal development of an estradiol–kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*, 150, 3214–3220. doi:10.1210/en.2008-1733

Colledge, WH. (2009). Transgenic mouse models to study GPR54/kisspeptin physiology. M. Tena-Sempere, H. Vaudry (Eds), *Peptides: Kisspeptins* içinde 30(1), 34–41. Elsevier. doi: 10.1016/j.peptides.2008.05.006

Conover, WJ. (1999). Practical Nonparametric Statistics (3 ed., ss. 272–288). New York: John Wiley & Sons. doi: 10.1080/00401706.2000.10486067

Çelik, H.T. ve Olfaz, M. (2018). Reproductive performance of Hair goat and growth traits of Hair goat and Saanen x Hair (F1) crossbred kids in rural conditions. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 24 (2): 296–302.

d'Anglemont de Tassigny, X., Jayasena, CN., Murphy, KG., Dhillon, WS., Colledge, WH. (2017). Mechanistic insights into the more potent effect of KP-54 compared to KP-10 in vivo. *PLoS One*, 12, e0176821. doi: 10.1371/journal

Daniel, JA., Foradori, CD., Whitlock, BK., Sartin, JL. (2013). Hypothalamic integration of nutrient status and reproduction in the sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), 44–52. doi: 10.1111/rda.12227

Daniel, JA., Foradori, CD., Whitlock, BK., Sartin, JL. (2015). Reproduction and beyond, kisspeptin in ruminants. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 23.

Decourt, C., Robert, V., Anger, K., Galibert, M., Madinier, J.B., Liu, X., ... Beltramo, M. (2016). A synthetic kisspeptin analog that triggers ovulation and advances puberty. *Scientific reports*, 6, 26908. doi: 10.1038/srep26908

Decourt, C. ve Beltramo, M. (2018). New insights on the neuroendocrine control of puberty and seasonal breeding in female sheep. *Animal Reproduction*, 15(Suppl.1), 856-867. doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0047

Decourt, C., Robert, V., Lomet, D., Anger, K., Georgelin, M., Poissenot, K., ... Beltramo, M. (2019). The kisspeptin analog C6 is a possible alternative to PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) for triggering synchronized and fertile ovulations in the Alpine goat. *Plos one*. doi: 10.1371/journal.pone.0214424

Delgadillo, JA., De Santiago-Miramontes, MA., Carrillo, E. (2007). Season of birth modifies puberty in female and male goats raised under subtropical conditions. *Animal*, 1 (6), 858-864. doi: 10.1017/S1751731107000080

Demir, H., Elmaz, Ö., Cerit, H. (2018). Keçilerde puberta ve eşeysel olgunluk yaşı. *Uludağ University, Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 37 (2), 143-150. doi: 10.30782/uluvfd.415214

Dungan, HM., Clifton, DK., Steiner, RA. (2006). Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin releasing hormone secretion. *Endocrinology*, 147(3), 1154– 8. doi: 10.1210/en.2005-1282

El-Tarabany, MS., Zagloul, AW., El-Tarabany, AA., Awad, A. (2017) Association analysis of polymorphism in KiSS1 gene with reproductive traits in goats. *Animal Reproduction Science*, 180, 92–9. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.006

Erdem, H. ve Sarıbay, M.K. (2019). Gebelik ve tanı yöntemleri. M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rışvanlı, A. Köker (Eds), *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji: Gebelik ve tanı yöntemleri içinde* (3. bs., ss. 441-452). Ankara: Medipres Basımevi.

El-Shahat, KH., Khaled, NF., El-Far, FI. (2010). Influence of dietary calcium salts of long chain fatty acids supplementation on growth and onset of puberty in Rahmani ewe- lambs. *Journal of Applied Biological Sciences*, 4 (2), 13-17.

Estrada, KM., Clay, CM., Pompolo, S., Smith, JT., Clarke, IJ. (2006). Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/lutenising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory rol for kisspeptinin oestrogen-possitive feedback. *Journal of Neuroendocrinology*, 18, 806-809. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01485.x

Ezzat A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T., ... Hashizume, T. (2009). Characteristics of the stimulatory effect of kisspeptin-10 on the secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and growth hormone in prepubertal male and female cattle. *Journal of Reproduction and Development*, 55, 650-654. doi: 10.1262/jrd.20255

Ezzat, A.A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Goto, Y., Nakajima, Y., ... Hashizume, T. (2010). The role of sexual steroid hormones in the direct stimulation by Kisspeptin-10 of the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin from bovine anterior pituitary cells. *Animal Reproduction Sci*, 121, 267–272. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.06.002

Farshad, A., Akhondzadeh, S., Zamiri, MJ, Sadeghi, GH. (2008). The estrous cycle of the Markhoz goat in Iran. *Asian-Austral Journal of Animal Sci*, 21(10), 1411-1415. doi: 10.5713/ajas.2008.70707

Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.T., Leboeuf, B. (2011). Reproductive cycle of goats. *Animal Reproduction Science*, 124 (3-4), 211-219. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.029

Foster, DL. (1994). Puberty in sheep. In *The physiology of reproduction*. E Knobil and JD Neill (Eds), pp. 411–451. Reven Press Ltd, New York, USA.

Foster, DL. ve Jackson, LM. (2006) Puberty in the sheep. JD Neill Ed, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (3. bs., ss. 2127–2176.) St Louis: Elsevier Academic Press. doi: 10.1016/B978-012515400-0/ 50044-0

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty A. (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptik area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. Elsevier. *Neuroscience Letters*, 401, 225-230. doi: 10.1016/j.neulet.2006.03.039

Freitas, V.J.F., Lopes-Junior, E.S., Rondina, D., Salmito-Vanderley, C.S.B., Salles, H.O., Simplicio, A.A., ... Saumande, J. (2004). Puberty in Anglo-Nubian and Saanen female kids raised in the semi-arid of North-eastern Brazil. Elsevier. *Small Ruminant Research*, 53, 167-172. doi: 10.1016/j.smallrumres.2003.07.005

Goodman, RL., Lehman, MN., Smith, JT., Coolen, LM., de Oliveira, CVR., Jafarzadehshirazi, MR., ... Clarke, IJ. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, 148(12), 5752–60. doi: 10.1210/en.2007-0961

Goodman, RL., Coolen, LM., Lehman, MN. (2014). A role for neurokinin B in pulsatile GnRH secretion in the Ewe. *Neuroendocrinology*, 99, 18–32. doi: 10.1159/000355285

Gottsch, ML., Cunningham, MJ., Smith, JT., Popa, SM., Acohido, BV., Crowley, WF., ... Steiner, RA. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145, 4073–7. doi: 10.1210/en.2004-0431

Greives, TJ., Mason, AO., Scotti, MA., Levine, J., Ketterson, ED., Kriegsfeld, LJ., Demas, GE. (2007). Environmental control of kisspeptin: implications for seasonal reproduction. *Endocrinology*, 148, 1158–66. doi: 10.1210/en.2006-1249

Gutierrez-Pascual, E., Martinez-Fuentes, AJ., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, MM., Castano, JP. (2007). Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, 19, 521–530. doi: 10.1111/j.1365-2826.2007.01558.x

Gutierrez-Pascual, E., Leprince, J., Martinez-Fuentes, AJ., Segalas- Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., ... Castano, JP. (2009). In vivo and in vitro structure activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Molecular Pharmacology*, 76, 58–67. doi: 10.1124/mol.108.053751

Han, SK., Gottsch, ML., Lee, KJ., Popa, SM., Smith, JT., Jakawich, SK., ... Herbison, AE. (2005). Activation of gonadotropin releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience*, 25, 11349-11356. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005

Hashizume, T., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Ezzat, AA., Sawai, K., Yamashita, T. (2010). Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Animal Reproduction Sci*, 118(1), 37-41. doi: 10.1016/J.ANIREPROSCI.2009.05.017

Hassaneen, A., Naniwa, Y., Suetomi, Y., Matsuyama, S., Kimura, K., Ieda, N., ... Ohkura, S. (2016). Immunohistochemical characterization of the arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) and preoptic kisspeptin neuronal populations in the hypothalamus during the estrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Development*, 62, 471–477. doi: 10.1262/jrd.2016-075

Herde, M., Iremonger, K., Constantin, S., Herbison, A. (2013). GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. *Journal of Neuroscience*, 33, 12689–97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0579-13.2013

Hernández-Hernández, J., Martin, GB., Becerril-Pérez, CM., Pro-Martínez, A., Cortez-Romero, C., Gallegos-Sánchez, J. (2021). Kisspeptin Stimulates the Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone (LH) during Postpartum Anestrus in Ewes Undergoing Continuous and Restricted Suckling. *Animals*, 11(9), 2656. doi: 10.3390/ANI11092656

Hoffman, GE., Le, WW., Franceschini, I., Caraty, A., Advis, JP. (2011). Expression of fos and in vivo median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe. *Endocrinology*, 152, 214–222. doi: 10.1210/en.2010-0066

Hu, KL., Zhao, H., Chang, HM., Yu, Y., Qiao, J. (2018). Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 365. doi: 10.3389/fendo.2017.00365

I'Anson, H., Manning, JM., Herbosa, CG., Pelt, J., Friedman, CR., Wood, RI., ... Foster, DL. (2000). Central inhibition of gonadotropin-releasing hormone secretion in the growth-restricted hypogonadotropic female sheep. *Endocrinology*, 141, 520–527. doi: 10.1210/endo.141.2.7308

Irwig, MS., Fraley, GS., Smith, JT., Acohido, BV., Popa, SM., Cunningham, MJ., ...Steiner, RA. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80, 264–272. doi: 10.1159/000083140

Jainudeen, M. R., Wahid, H., Hafez, E. S. E. (2016). Sheep and Goats. *Reproduction in Farm Animals*, 12, 172-181. doi: 10.1002/9781119265306.ch12

Jing, X., Peng, Q., Hu, R., Wang, H., Yu, X., Degen, A., ... Wang, Z. (2017). Effect of supplements during the cold season on the reproductive system in prepubertal Tibetan sheep ewes. *Animal Science Journal*, 88, 1269-1278. doi: 10.1111/asj.12762

Kadokawa, H., Suzuki, S., Hashizume, T. (2008). Kisspeptin-10 stimulates the secretion of growth hormone and prolactin directly from cultured bovine anterior pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, 105, 404–408. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.11.005

Kafa, İ. ve Eyigör Ö. (2011). Kisspeptinler ve Kisspeptin Nöronları: Üreme Sistemi Üzerine Etkileri ve Hipotalamik Yerleşimleri. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 37(1), 53-60.

Kim, J., Semaan, S.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Dhamija, S., Kauffman, A.S. (2011). Regulation of Kiss1 expression by sex steroids in the amygdala of the rat and mouse. *Endocrinology*, 152, 2020-2030. doi: 10.1210/en.2010-1498

Kumar, D., Freese, M., Drexler, D., Hermans- Borgmeyer, I., Marquardt, A., Boehm, U. (2014). Murine arcuate nucleus kisspeptin neurons communicate with GnRH neurons in utero. *Journal of Neuroscience*, 34, 3756-3766. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5123-13.2014

Lehman, MN., Coolen, LM., Goodman, RL. (2010). Minireview: kiss- peptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releas- ing hormone secretion. *Endocrinology*, 151(8), 3479–89. doi: 10. 1210/ en. 2010- 0022

Leonardi, CEP., Dias, FCF., Adams, GP., Araujo, ER., Singh, J. (2019). Kisspeptin induces ovulation in heifers under low plasma progesterone concentrations. *Theriogenology*, 141, 26–34. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.08.033

Malpaux, B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals. Neill JD (Eds). *Knobil and Neill`s physiology of reproduction* (3. bs., ss. 2231-2281). St. Louis, USA: Elsevier Academic Press.

Manfredi-Lozano, M., Roa, J., Tena-Sempere, M. (2018). Connecting metabolism and gonadal function: novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Frontiers Neuroendocrinol*, 48, 37-49. doi: 10.1016/j.yfrne.2017.07.008

Matsuda, F., Nakatsukasa, K., Suetomi, Y., Naniva, Y., Ito, D., Inoue, Y., ... Okhura, S. (2015). The luteinising hormone surge-generating system is functional in male goats as in females: Involvement of kisspeptin neurones in the medial preoptic area. *Journal of Neuroendocrinology*, 27, 57–65. doi: 10.1111/jne.12235

Matsuda, F., Ohkura, S., Magata, F., Munetomo, A., Chen, J., Sato, M., ... Tsukamura, H. (2019). Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non-rodent mammals. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45 (12), 2318-2329. doi: 10.1111/JOG.14124

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320(2), 383–388. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.185

Matsuyama, S., Ohkura, S., Mogi, K., Wakabayashi, Y., Mori, Y., Tsukamura, H., ... Okamura, H. (2011). Morphological evidence for direct interaction between kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone neurons at the median eminence of the male goat: an immunoelectron microscopic study. *Neuroendocrinology*, 94, 323–32. doi: 10.1159/000331576

McDonald's. (2003). Female Reproductive System. M.H. Pineda, M.P. Dooley (Eds), *Veterinary Endocrinology and Reproduction: Female Reproductive System* içinde (5. bs., ss. 283-340). Iowa/USA: Iowa State Press.

Meza-Herrera, CA., Gonzalez-Bulnes, A., Kridli, RT., Mellado, M., Arechiga-Flores, CF., Salinas, H., Luginbuhl, JM. (2010). Neuroendocrine, metabolic and genomic cues signalling the onset of puberty in females. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, e495–e502. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01355.x

Moenter, SM., Caraty, A., Locatelli, A., Karsch, FJ. (1991). Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: Existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology*, 129, 1175–1182.

Moenter, SM., Brand, RM., Midgley, AR., Karsch, FJ. (1992). Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology*, 130, 503–510. doi: 10.1210/endo.130.1.1727719

Moore, AM., Prescott, M., Czielesky, K., Desroziere, E., Yip, SH., Campbell RE., Herbison AE. (2018). Synaptic innervation of the GnRH neuron distal dendron in female mice. *Endocrinology*, 159(9), 3200–8. doi: 10.1210/en.2018-00505

Navarro, VM., Castellano, JM., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro ML, Roa, J., Sanchez-Criado, JE., ... Tena-Sempere, M. (2004a). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*, 145, 4565–74. doi: 10.1210/en.2004-0413

Navarro. VM., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, JM., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, ML., Tena-Sempere, M. (2004b). Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *Journal of Physiology* 561, 379–386. doi:10.1113/jphysiol.2004.072298

Navarro, VM., Castellano, JM., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., ... Tena-Sempere, M. (2005). Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 146, 1689–1697. doi: 10.1210/en.2004-1353

Navarro, VM., Gottsch, ML., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, DK., Steiner RA. (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *Journal of Neuroscience*, 29, 11859–11866. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009

Navarro, VM. ve Tena-Sempere, M. (2011). Neuroendocrine control by kisspeptins: role in meta- bolic regulation of fertility. *Nature Reviews Endocrinology*, 8, 40–53.

Neill, JD., Patton, JM., Dailey, RA., Tsou, RC., Tindall, GT. (1977). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in pitui- tary stalk blood of rhesus monkeys: Relationship to level of LH release. *Endocrinology*, 101, 430–434.

Ohkura, S., Uenoyama, Y., Yamada, S., Homma, T., Takase, K., Inoue, N., ... Tsukamura H. (2009a). Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. M. Tena-Sempere, H. Vaudry (Eds), *Peptides: Kisspeptins* içinde 30(1), 49–56. Elsevier. doi: 10.1016/j.peptides.2008.08.004

Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., ... Okamura, H. (2009b). Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 813–21. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01909.x

Oshimo, Y., Munetomo, A., Magata, F., Suetomi, Y., Sonoda, S., Takeuchi, Y., ... Matsuda, F. (2021). Estrogen increases KISS1 expression in newly generated immortalized KISS1-expressing cell line derived from goat preoptic area. *Journal of Reproduction and Development*, 67(1), 2020-053. doi: 10.1262/JRD.2020-053

Özmen, MF., Şireli, HD., Cirit, Ü., Çınar EM., Say, E. (2021). Mevsim dışında östrus senkronizasyonu uygulanmış kilis çebiçlerinde eCG uygulama zamanının fertilité üzerindeki etkileri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dergisi*, 6(3), 139- 142. doi: 10.24880/maeuafd.977775

Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, JE., Szereszewski, JM., Ahow, MR., Zajac, M., ... Babwah, AV. (2009) Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and b-arrestin. *Molecular Endocrinology*, 23, 2060–2074. doi: 10.1210/me.2009-0013

Papachristoforou, C., Koumas, A., Photiou, C. (2000). Seasonal effects on puberty and reproductive characteristics of female Chios sheep and Damascus goats born in autumn or in February. *Small Ruminant Research Elsevier*, 38 (1), 9-15. doi: 10.1016/S0921-4488(00)00143-7

Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z., Moenter, SM. (2008) Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, 49, 1979–1986. doi: 10.1210/en.2007-1365

Pielecka-Fortuna, J. ve Moenter, SM. (2010) Kisspeptin increases γ -aminobutyric acid ergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology*, 151, 291–300. doi: 10.1210/en.2009-0692

Pheng, V., Uenoyama, Y., Homma, T., Inamoto, Y., Takase, K., Yoshizawa- Kumagaye, K., ... Tsukamura, H. (2009). Potencies of centrally or peripherally injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats. *Journal of Reproduction and Development*, 55, 378–82. doi: 10.1262/jrd.20240

Plant, TM., Ramaswamy, S., Dipietro, MJ. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin releasing hormone discharges. *Endocrinology*, 147, 1007–1013. doi: 10.1210/en.2005-1261

Prashar, V., Arora, T., Singh, R., Sharma, A., Parkash, J. (2022). Hypothalamic Kisspeptin Neurons: Integral Elements of the GnRH System. *Reproductive Sciences*, 1-21. doi: 10.1007/S43032-022-01027-5

Redmond, JS., Macedo, GG., Velez, IC., Caraty, A., LWilliams, G., Amstalden, M. (2011). Kisspeptin activates the hypothalamic–adenohypophyseal–gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction*, 141(4), 541-548. doi: 10.1530/REP-10-0467

Rivera, GM., Alanis, GA., Chaves, MA., Ferrero SB., Morello HH. (2003). Seasonality of estrus and ovulation in Creole goats of Argentina. *Small Ruminant Research*, 48(2), 109-117. doi: 10.1016/S0921-4488(02)00236-5

Rosales Nieto, CA., Ferguson, MB., Macleary, CA., Briegel, JR., Martin, GB., Thompson, AN. (2013). Selection for superior growth advances the onset of puberty and increases reproductive performance in ewe lambs. *Animal*, 7, 990–997. doi: 10.1017/S1751731113000074

Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Goto, Y., Jin, J., Sawai, K., Hashizuma, T. (2012). Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. *Animal Science Journal*, 83(6), 487-492. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00978.x

Sakamoto, K., Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Tanaka, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., Okamura, H. (2013). A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect phenomenon in goats. *PLoS One*, 8, e81017. doi: 10.1371/journal.pone.0081017

Sarkar, DK., Chiappa, SA., Fink, G., Sherwood, NM. (1976). Gonadotropin releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*, 264, 461–463.

Sébert, ME., Lomet, D., Saïd, B., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, RJ., Caraty, A. (2010). Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol. *Domestic Animal Endocrinology*, 38(4), 289-298. doi: 10.1016/J.DOMANIEND.2010.01.001

Seminara, SB., Dipietro, MJ., Ramaswamy, S., Crowley, Jr WF., Plant, TM. (2006). Continuous human metastatin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54 induced gonadotropin releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology*, 147, 2122–6. doi: 10.1210/en.2005-1550

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, SB., Crowley, WF., Ojeda, SR., Plant, TM. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2129–2134. doi: 10.1073/pnas.0409822102

Smith, JT., Cunningham, MJ., Rissman, EF., Clifton, DK., Steiner, RA. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146, 3686–3692. doi: 10.1210/en.2005-0488

Smith, JT., Popa, SM., Clifton, DK., Hoffman, GE., Steiner, RA. (2006). Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6687. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1618-06.2006

Smith, JT., Clay, CM., Caraty, A., Clarke, IJ. (2007). Kiss-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology*, 148, 1150–1157. doi: 10.1210/en.2006-1435

Smith, JT., Coolen, LM., Kriegsfeld, LJ., Sari, IP., Jaafarzadehshirazi, MR., Maltby, M., ... Lehman, MN. (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 149, 5770–5782. doi: 10.1210/en.2008-0581

Smith, JT., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, RP., Clarke, IJ. (2008) Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology*, 149, 1951–1959. doi:10.1210/en.2007-1425

Smith, JT., Li, Q., Pereira, A., Clarke IJ. (2009). Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 150, 5530–5538. doi: 10.1210/en.2009-0712

Smith, JT. ve Clarke, IJ. (2010) Seasonal breeding as a neuroendocrine model for puberty in sheep. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, 324, 102-109. doi: 10.1016/j.mce.2010.03.007

Spiegel, DJ. (2019). Modulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and secretion in mice by non-peptide neurotransmitters, gasotransmitters, and gliotransmitters. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 10, 329. doi: 10.3389/fendo.2019.00329.

Suzuki, S., Kadokawa, H., Hashizume, T. (2008). Direct kisspeptin-10 stimulation on luteinizing hormone secretion from bovine and porcine anterior pituitary cells. *Anim. Reprod Sci*, 103, 360–365. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.016

Tanaka, T., Ohgata, N., Kamomae, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., Karsch, FJ. (1997). Hypophyseal portal blood collection for analysis of GnRH neurosecretion in Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*, 43, 101–106. doi: 10.1262/jrd.43.101

Tanaka, T., Ohkura, S., Wakabayashi, Y., Okamura, H. (2012). Effect of peripherally administered kisspeptin-10 on GnRH neurosecretion into the hypophyseal portal circulation in ovariectomized goat does. *Small Ruminant Research*, 105(1-3), 273-276. doi: 10.1016/J.SMALLRUMRES.2012.01.007

Teles, MG., Bianco, SD., Brito, VN., Trarbach, EB., Kuohung, W., Xu, S., ... Latronico, AC. (2008). A GPR54- activating mutation in a patient with central precocious puberty. *New England Journal of Medicine*, 358, 709–15. doi: 10.1056/NEJMoa073443

Tena-Sempere, M. (2006). GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update*, 12(5), 631-639. doi: 10.1093/humupd/dml023

Tovar, S., Vázquez, M.J., Navarro, V.M., Ferández-Ferández, R., Castellano, J.M., Vigo, E., ... Tena-Sempere, M. (2006). Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology*, 147, 2696–2704. doi: 10.1210/en.2005-1397

Uçar, M. ve Özyurtlu, N. (2019). Üremenin denetlenmesi. M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rışvanlı, A. Köker (Eds), *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji: Üremenin denetlenmesi* içinde (3. bs., ss. 429-440). Ankara: Medipres Basımevi.

Uenoyama, Y., Pheng, V., Tsukamura, H., Maeda, KI. (2016). The roles of kisspeptin revisited: Inside and outside the hypothalamus. *Journal of Reproduction and Development*, 62, 537–545. doi: 10.1262/jrd.2016-083

Uenoyama, Y., Inoue, N., Maeda, KI., Tsukamura, H. (2018). The roles of kisspeptin in the mechanism underlying reproductive functions in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 64, 469–476. doi: 10.1262/jrd.2018-110

Uenoyama, Y., Inoue, N., Nakamura, S., Tsukamura, H. (2019). Central mechanism controlling pubertal onset in mammals: A triggering role of kisspeptin. *Frontiers in Endocrinology*, 10. doi: 10.3389/fendo.2019.00312

Uenoyama, Y., Nagae, M., Tsuchida, H., Inoue, N., Tsukamura, H. (2021). Role of KNDy neurons expressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin A as a GnRH pulse generator controlling mammalian reproduction. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 12, 724632. doi: 10.3389/fendo.2021.724632

Urias-Castro, C., Arreguin-Arevalo, JA., Magee, C., Weber, ER., Nett, TM. (2019). Hypothalamic concentrations of kisspeptin and gonadotropin releasing hormone during the breeding season and non-breeding season in ewes. *American Journal of Reproductive Immunology*, 82, e13146. doi: 10.1111/aji.13146

Valasi, I., Chadio, S., Fthenakis, G.C., Amiridis, G.S. (2012). Management of prepubertal small ruminants: Physiological basis and clinical approach. *Animal Reproduction Science*, 130(3-4), 126-134. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.01.005

Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, VM., ... Okamura, H. (2010). 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. *Journal of Neuroscience*, 30, 3124–3132. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5848-09.2010

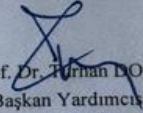
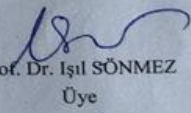
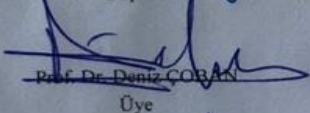
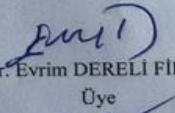
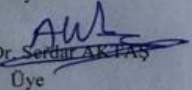
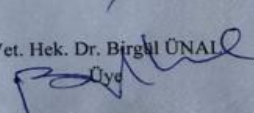
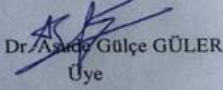
Wang, J., Sun, L., Zhang, T., Zhou, H., Lou, Y. (2012). Effect of Peripheral Administration of Kisspeptin-10 on Dynamic LH Secretion in Prepubertal Ewes. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(6), 785. doi: 10.5713/AJAS.2011.11390

Watanabe, Y., Uenoyama, Y., Suzuki, J., Takase, K., Suetomi, Y., Ohkura, S., ... Tsukamura, H. (2014). Oestrogen-induced activation of preoptic kisspeptin neurones may be involved in the luteinising hormone surge in male and female Japanese monkeys. *Journal of Neuroendocrinology*, 26, 909–917. doi: 10.1111/jne.12227

Whitlock, B.K., Daniel, J.A., Wilborn, R.R., Rodning, S.P., Maxwell, H.S., Steele, B.P., Sartin, J.L., (2008). Interaction of estrogen and progesterone on kisspeptin-10 stimulated luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized cows. *Neuroendocrinology*, 88, 212–215. doi: 10.1159/000146242

EKLER

Ek 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Onayı (Aydın ADÜ-HADYЕК)

	T.C. AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (AYDIN ADÜ-HADYЕК)	
Aydın, 25/12/2019		
Oturum	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2019 Yılı XII. Oturum	
Sayı	: 64583101/2019/137	
Proje Başlığı	: Prepubertal Dişi Keçilerde Kissseptin Uygulamasının Pubertas ve Fertilité Üzerine Etkinliğinin Araştırılması	
Proje Yürütücüsü	: Hakkı Bülent BECERİKLİSOY	
Proje Ekibi	: Cem AKSU	
	Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:	
	İnsan embriyosu ve fıtusu kullanılması	
	İnsan embriyosu ve fıtusu dokularının kullanılması	
	Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması	
Hayvan Çalışması	İnsanlarda araştırma	
	İnsan olmayan primatların kullanılması	
	Transgenik hayvanların kullanılması	
	Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.	
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.		
		
Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN Başkan	Prof. Dr. Tüphan DOST Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ Üye
		
Prof. Dr. Deniz ÇOBAN Üye	Prof. Dr. Yücel KOÇA Üye	Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN Üye
		
Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ Üye	Vet. Hek. Dr. Birgül ÜNAL Üye	Öğr. Gör. Dr. Asude Gülçe GÜLER Üye
	(Toplantıya Katılmadı) Yurdağül ALTINBAŞ Üye	

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“Prepubertal Dişi Keçilerde Kisspeptin Uygulamasının Pubertas ve Fertilite Üzerine Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı Doktora tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Cem AKSU

.../.../2023

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Aksu, Cem
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve tarihi : Denizli 22/10/1984
Telefon : 0 532 544 04 63
E- mail : aksujinekoloji@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi	02.07.2008

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2011-2017	Manisa İl Tarım ve Orman Müdürlüğü	Veteriner Hekim
2017-	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Veteriner Hekim