



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİŞİ SIÇANLARDA KİSSPEPTİN VE
AROMATAZ İNHİBİSYONUNUN KOGNİTİF
FONKSİYONLAR VE DAVRANIŞ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Siğnem EYUBOĞLU DİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Sinan CANPOLAT

TRABZON-2013



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİŞİ SIÇANLARDA KİSSPEPTİN VE
AROMATAZ İNHİBİSYONUNUN KOGNİTİF
FONKSİYONLAR VE DAVRANIŞ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Siğnem EYUBOĞLU DİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Sinan CANPOLAT

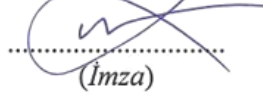
TRABZON-2013

ONAY SAYFASI

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ahmet AYAR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı


(İmza)

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sıgıem Eyuboğlu Dinç' in hazırladığı “**Dişi sıçanlarda Kisspeptin ve Aromataz inhibisyonunun kognitif fonksiyonlar ve davranış üzerine etkileri**” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet AYAR



Prof. Dr. Selim KUTLU



Doç. Dr. Sinan CANPOLAT



Tarih:/.../2013

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 03/01/2013

Siğnem EYUBOĞLU DİNÇ

.....
(İmza)

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini gördüğüm danışman hocam Sayın **Doç. Dr. Sinan CANPOLAT**'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Ahmet AYAR**'a şükranlarımı sunarım. Nöroendokrinoloji ve fizyolojinin diğer alanlarındaki derin bilgisinden yararlanma şansını yakaladığım ve kendisini tanıdığım yaklaşık dört sene boyunca bana yoğun çalışma azmi aşılayıp tecrübelerini paylaşan değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Bayram YILMAZ**'a; tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan hocam Sayın **Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ**'a; deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın **Doç. Dr. Dilek TELCİ**'ye, Sayın **Vet. Hek. Burcu ÇEVRELİ**'ye, Sayın **Vet. Hekim Özgür Bulmuş**'a; istatistiksel analizlerde tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı Sayın **Yard. Doç. Dr. Çiğdem KASPAR**'a, tezimde ve diğer çalışmalarda da beraber çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım ve dostlarım **Dr. Birsen ELİBOL CAN**'a, **Uzm. Dr. Hatice AKKAYA**'ya, **Ayca Zeynep ILTER**'e; **Mustafa Çağlar BEKER** ve **Sami AĞUŞ**'a, her konuda maddi ve manevi olarak beni destekleyen ve hep yanımda olan, bana güvenen sevgili **aileme**, özellikle davranış analizleri için arenalar tasarlayarak hepimizi şaşırtan ve kendine hayran bırakan sevgili babam **Yaşar Naci EYUBOĞLU**'na, tezimin her aşamasında yanımda olup desteklerini esirgemeyen biricik eşim **Turgay DİNÇ**'e

Sonsuz Teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Siğnem EYUBOĞLU DİNÇ

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

İç Kapak	
ONAY SAYFASI	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1 Kisspeptin	4
4.1.1 Kisspeptinin Biyokimyası	4
4.1.2 Kisspeptin Reseptörü (KISS1R, GPR54)	5
4.1.3 Kisspeptin ve KiSS1R Hücrelerinin Lokalizasyonu	7
4.2 Kisspeptin ve KISS1R Sisteminin Fizyolojik Etkileri ve Aktivasyonu	10
4.3 Aromataz (Östrojen Sentaz) Enzimi	14
4.3.1 Östrojen Biyosentezi	14
4.3.2 Aromataz İnhibisyonu ve Letrozol	14
4.4 Öğrenme ve Hafıza	16
4.4.1 Tanımı	16
4.4.2 Epizodik (Olaysal) Bellek	18
4.4.3 Mekansal (Spatial) Bellek ve Morris Su labirenti Testi	19
4.4.4 Hipokampus	20
5. GEREÇ ve YÖNTEM	22
5.1 Deney Hayvanları	22
5.1.1 Davranış Testleri	22
5.1.2 Lokomotor Aktivite Testi	22

	vii
5.1.3 Kuyruktan Asma Testi	24
5.1.4 Morris Su Labirenti Testi	24
5.1.5 Karanlık-Aydınlık Alan Testi	26
5.1.6 Beam Denge Testi	26
5.2 İntraserebroventriküler Uygulama	27
5.2.1 Ozmotik Pompaların Hazırlanması	27
5.2.2 Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması	27
5.2.3 Stereotaksi	28
5.2.4 Hayvanların Hazırlanması	29
5.2.5 Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi	29
5.3 Dokuların Elde Edilmesi	30
5.4 Western Blot Yöntemiyle Sinaptofizin ve PSD-95 Analizi	30
5.4.1 Protein İzolasyonu	30
5.4.2 Protein Miktarlarının Fluorometrik Tayini	30
5.4.3 Protein Örneklerinin Hazırlanması	30
5.4.4 Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE	31
5.4.5 Western Blot Analizi	31
5.5 Cresyl Violet Boyaması ile Nöron Sayılarının Belirlenmesi	31
5.5.1 Örneklerin Hazırlanması	31
5.5.2 Cresyl Violet Boyaması	32
5.6 Serum Hormon Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	32
5.6.1 Serum Elde Edilmesi	32
5.6.2 Serum 17β-E2 Konsantrasyonunun Ölçülmesi	32
5.7 Sıçanlarda Vajinal Smear Değerlendirilmesi	32
5.8 İstatistiksel Analiz	33
6. BULGULAR	34
6.1 Ağırlık Ölçümleri	34
6.2 Davranış Testleri	34
6.2.1 Lokomotor Aktivite Testi Bulguları	34
6.2.2 Kuyruktan Asma Testi Bulguları	35
6.2.3 Karanlık-Aydınlık Alan Testi Bulguları	36
6.2.4 Beam Denge Testi Bulguları	36
6.2.5 Morris Su Labirenti Testi Bulguları	37

	viii
6.3 Cresyl Violet Boyaması Bulguları	38
6.4 Western Blot Bulguları	40
6.5 Serum Östrojen Düzeyleri ELISA Bulguları	41
6.6 Rat Uterotropik Test Bulguları	41
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	42
8. KAYNAKLAR	46
9. ETİK KURUL ONAYI	54
10. ÖZGEÇMİŞ	55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kisspeptin ve reseptörünün karakteristik özellikleri	13
Tablo 2. Deney grupları	22
Tablo 3. Örneklerin hazırlanması	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Kisspeptin geninin kromozom üzerindeki lokasyonu	5
Şekil 2. GPR54 reseptörünün şematik gösterimi	6
Şekil 3. Seks steroidlerinin kisspeptin ekspresyonuna olan etkileri	8
Şekil 4. Kisspeptinin GnRH nöronları üzerine etkisinin şematik gösterimi	11
Şekil 5. KISS1R ve ligandının GnRH nöronları üzerindeki hücresel aktivasyonu	12
Şekil 6. Merkezi sinir sisteminde östrojenlerin sentez basamakları	15
Şekil 7. Hafızanın sınıflandırılması	17
Şekil 8. Deneysel çalışma takvimi	22
Şekil 9. Lokomotor aktivite ölçüm cihazını temsilen çizilen düzenek	23
Şekil 10. Kuyruktana asma testi için hazırlanan düzenek	25
Şekil 11. Morris su labirenti testi düzeneği	26
Şekil 12. Karanlık-aydınlık alan testi için hazırlanan pleksiglas düzenek	27
Şekil 13. Beam Denge testinde kullanılan düzenek	28
Şekil 14. Sıçan beyin atlasına göre Lateral ventrikül koordinatları	29
Şekil 15. Sıçanların ölçülen ortalama ağırlıkları	35
Şekil 16. Locomotor aktivite testi yer değiştirme haritaları	35
Şekil 17. Locomotor aktivite testi alınan yol grafiği	36
Şekil 18. Kuyruktan asma testi sonuçları	36
Şekil 19. Karanlık/Aydınlık Alan test sonuçları	37
Şekil 20. Beam denge testi sonuçları	37
Şekil 21. Prob test sırasında ortalama hareket hızı	38
Şekil 22. A40 alanında geçirilen ortalama süreler ve platformun olduğu çeyrekte geçirilen ortalama süre değerleri	38
Şekil 23. Koronal beyin dokusu Cresyl violet boyaması ve hipokampus temsili görüntüsü	39
Şekil 24. Cresyl violet boyaması sonuçları	40
Şekil 25. Western blot sonuçları	41
Şekil 26. Serum 17 β -E ₂ konsantrasyonu	42
Şekil 27. Uterotropik Test sonuçları	42

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AA	Amino asit
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionik asit
ArKO	Aramotaz knockout
AVPV	Anteroventralperiventriküler nükleus
CA1	Cornu ammonis-1
CA3	Cornu ammonis-3
CA4	Cornu ammonis-4
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CV	Cresyl Violet
DAG	Diaçil gliserol
DG	Dentate gyrus
DNA	Deoksiribonükleik asit
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
EPSC	Eksitator postsinaptik akım
ER	Endoplazmikretikulum
ERK	Ekstrasellüler regüle edilen kinaz
FSH	Folikül stimulan (uyarıcı) hormone
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormone
GPR54	G protein bağlı reseptör-54
ICV	İntraserebroventriküler
IHH	İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm
IP2	İnositol-1,4,5- trifosfat
IM	Kas içi (intramuskular/ entramüsküler)
Kb	Kilo baz çifti
KİSS-1	Kisspeptin
LH	Luteinizan hormon

LMA	Lokomotor Aktivite
LTM	Uzun süreli bellek
LTP	Uzun dönemli potansiyasyon
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
MSL	Morris su labirenti testi
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTL	Medial temporal lob
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
17β-E2	17 β -östradiol
P450arom	Aromataz (sitokrom P450)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PeN	Periventriküler nükleus
pERK	Fosforile ekstrasellüler regüle edilen kinaz
PFA	Paraformaldehit
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIP2	Fosfatidilinositol
PKC	Protein Kinaz C
PLC	Fosfolipaz-C
PSD95	Postsinaptik densite protein-95
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RF motifi	Arjinin- Fenilalanin motifi
SD	Standart Sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
STM	Kısa süreli bellek
SYP	Sinaptofizin
YUDETAM	Yeditepe Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi

Simgeler

°C	Santigrat derece
Ca⁺²	Kalsiyum iyonu
cm	Santimetre
g	Gram
K⁺	Potasyum iyonu
kDa	Kilo dalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
nmol	Nanomol
pg	Pikogram

ÖZET

Dişi Sıçanlarda Kisspeptin ve Aromataz İnhibisyonunun Kognitif Fonksiyonlar ve Davranış Üzerine Etkileri

Kisspeptin, KiSS-1 geni tarafından kodlanan ve başta hipotalamus olmak üzere farklı beyin bölgelerinde bulunan bir nöropeptittir. Kisspeptin ve reseptörü olan GPR54'ün hipokampus ve korteks gibi kognitif fonksiyonlar ve davranışla ilgili beyin bölgelerinde de ifade edildiği gösterilmiştir. Ancak, hipokampustaki kisspeptin/GPR54 sisteminin fonksiyonu in vivo modellerde araştırılmamıştır. Bu nedenle, bu tez projesinde kisspeptin ve letrozolün öğrenme, hafıza, motor fonksiyonlar (hayvan aktivitesi), depresyon ve anksiyete gibi davranışlar üzerine etkileri ile mekanizmaları araştırılmıştır. Kisspeptin nöronal aktivitesi östrojen tarafından düzenlenmektedir. Bu nedenle deney modelinde bir aromataz inhibitörü olan letrozol kullanılarak bu steroid hormonun sentezi baskılandı. Bu amaçla dişi Sprague/Dawley sıçanlar dört gruba ayrıldı: Kontrol, kisspeptin (10 nmol/gün), letrozol (1 mg/kg oral) ve kisspeptin + letrozol. Tüm hayvanlara anestezi altında Alzet ozmotik pompa ve ICV infüzyon kiti stereotaksik cihaz ile yerleştirildi. Maddeler 28 gün boyunca uygulandı. Deney öncesi ve sonunda öğrenme, hafıza (Morris su labirenti), hayvan aktivitesi (lokomotor aktivite ve beam denge testi), depresyon (kuyruktan asma testi) ve anksiyete (karanlık-aydınlık alan testi) davranışları incelendi. Deneyler dekapitasyonla sonlandırıldıktan sonra kan örnekleri alınarak ve serum östrojen düzeyleri ELISA ile belirlendi. Beyin dokusu kesitlerinde hipokampus ve sensori-motor korteks nöron sayıları cresyl violet boyaması; ERK1/2 yollarındaki değişiklikler, PSD-95 ve Sinaptofizin protein ifadeleri Western Blot metodu kullanılarak analiz edildi. Sonuçların istatistiksel analizlerinde One-Way ANOVA kullanıldı. Kontrole göre diğer 3 grubun fosforile olmuş ERK-2 protein miktarları anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0.05$). Letrozol grubu ile karşılaştırıldığında kiss + letrozol grubunun lokomotor aktivitesinin anlamlı olarak arttığı belirlendi. Sonuç olarak, kisspeptin / GPR54 sistemi ERK-2 yolağı üzerinden öğrenme ve hafızayı etkileyebilir. Ancak, kisspeptinin öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini araştırmak için farklı doz grupları eklenerek ve/veya öğrenme-hafıza yoksunluğu olan/oluşturulan hayvan modellerinin kullanılması yararlı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Anksiyete ve Depresyon davranışları, Kisspeptin, Letrozol, öğrenme ve hafıza, östrojen

SUMMARY

Effects of Kisspeptin and Aromatase Inhibition on Cognitive Functions and Behavior in Female Rats

Kisspeptin (encoded by KiSS-1 gene) is a neuropeptide in various brain regions, especially in the hypothalamus. Expressions of this kisspeptin and its receptor (GPR54) have been shown in other brain areas such as hippocampus and cortex. However, function of kisspeptin/GPR54 system in the hippocampus has not been studied using in vivo models. Therefore, in this project, effects of kisspeptin and letrozol on learning, memory, animal activity (motor functions), depression and anxiety behavior and their underlying mechanisms were investigated. Kisspeptin's neuronal activity is modulated by estrogen. Therefore, in this experimental model an aromatase inhibitor (letrozole) was used to block synthesis of this steroid hormone. Adult female Sprague/Dawley rats were allocated in four groups: Control, kisspeptin (10 nmol/ day), letrozole (1 mg/kg oral) and kisspeptin + letrozole. Alzet mini osmotic pump and ICV infusion kits were inserted by using a stereotaxic frame under anesthesia. Drugs were infused for 28 days. Cognitive functions (Morris Water Maze), animal activity (open field and beam tests), depression (tail suspension test) and anxiety (dark/light test) behavior were determined before and at the end of experiments. Experiments were ended by decapitation and blood samples obtained. Serum estradiol levels were determined by ELISA method. Frozen brain sections were cut on cryostat. Number of neurons, changes in Erk 1/2 pathways and PSD-95 and Synaptophysin protein expression were determined by cresyl violet staining, Western blotting in hippocampus, sensory-motor cortex. Data were statistically analyzed by using One-Way ANOVA. Phosphorylated ERK-2 protein levels were significantly increased in the test groups compared to the control values ($p < 0.05$). Locomotor activity of the animals in the kisspeptin + letrozol group was significantly increased compared to the letrozol infused group alone ($p < 0.05$). In conclusion, kisspeptin / GPR54 system may affect learning and memory through Erk-2 pathway. However, kisspeptin's effects on cognitive functions may be further elucidated by using different dose groups and/or memory deficit induced animal models.

Key Words: Anxiety and depression behavior, Kisspeptin, Letrozole, learning and memory, estrogen

3 GİRİŞ ve AMAÇ

Kisspeptin ve GPR54 sisteminin püberteye geçişteki etkin rolü ve seks steroidlerinin hipotalamusta KISS1 mRNA sentezini düzenleyici etkisi ile ilgili literatürde birçok yayın bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda GPR54 reseptörünün hipokampusta etkisi henüz belirlenmemiştir.

Bu çalışmada hipokampusta kisspeptin ve GPR54 sisteminin etki mekanizması, rastgele seçilmiş hayvan gruplarında, öğrenme yetenekleri bakımından bireyler arası varyasyon ve bu varyasyonun temelinde yatan beyindeki biyokimyasal değişiklikler in belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak aromataz inhibisyonu uygulanarak östrojenin hipotalamustaki gibi hipokampüste de bu sistem üzerine düzenleyici etkisi olup olmadığı araştırma hedeflerinden biridir.

Öğrenme deneylerinde Morris su labirenti testi, anksiyete ve agresyon davranışlarını test etmek amacıyla karanlık-aydınlık alan testi, lokomotor aktivite ve kuyruktan asma testi, nörolojik hasarı belirlemek için ise beam denge testi uygulanan maddelerin davranışa etkilerini araştırmak amacıyla uygulanmıştır.

Uygulanan tedaviler sonucunda, öğrenme ve bellek konusunda etkin bir rol oynadığı düşünülen PSD95 (Post sinaptik densite-95) proteininin hipoampüsteki ekspresyonuna odaklanılmıştır. Ayrıca sinaptik veziküllerde bulunan integral bir protein olan (Sinaptofizin) ve hücre içi sinyal yollarında rol oynayan ERK1/2 fosforilasyonu da incelenmiştir

Bu tez çalışması ile öğrenme ve bellek çalışmalarında rolü araştırılmış moleküler işaretlerin hipokampüste ekspresyon farklılıklarını davranış testleri performansına bağlı olarak araştırmak ve Kisspeptin/GPR54 sisteminin kognitif fonksiyonlar, öğrenme – bellek üzerine etkilerini gösterilmesi amaçlanmıştır.

4 GENEL BİLGİLER

4.1 Kisspeptin

Kisspeptin, 1996 yılında Lee ve arkadaşları tarafından insan metastatik melanoma kanser hücreleri ile yapılan çalışmada metastaz baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır (1). KISS genindeki “SS” harfleri, baskılayıcı diziyi (suppressor sequence) ifade ederken “KI” harfleri bu genin Pensilvanya Hershey’de keşfedilmesi sebebiyle yöreye ait ünlü Kiss çikolatasına ithafen eklenmiştir (1).

GPR54 plasenta, hipofiz, pankreas ve spinal kord gibi vücudun çeşitli dokularında ifade edilmektedir. Özellikle beyin bölgeleri incelendiğinde talamus, hipokampus, substansiya nigra ve amigdalada eksprese edilmektedir (2). Kisspeptinin de plasenta ve beyinde yüksek oranda sentezlendiği gösterilmiştir (3).

4.1.1 Kisspeptinin Biyokimyası

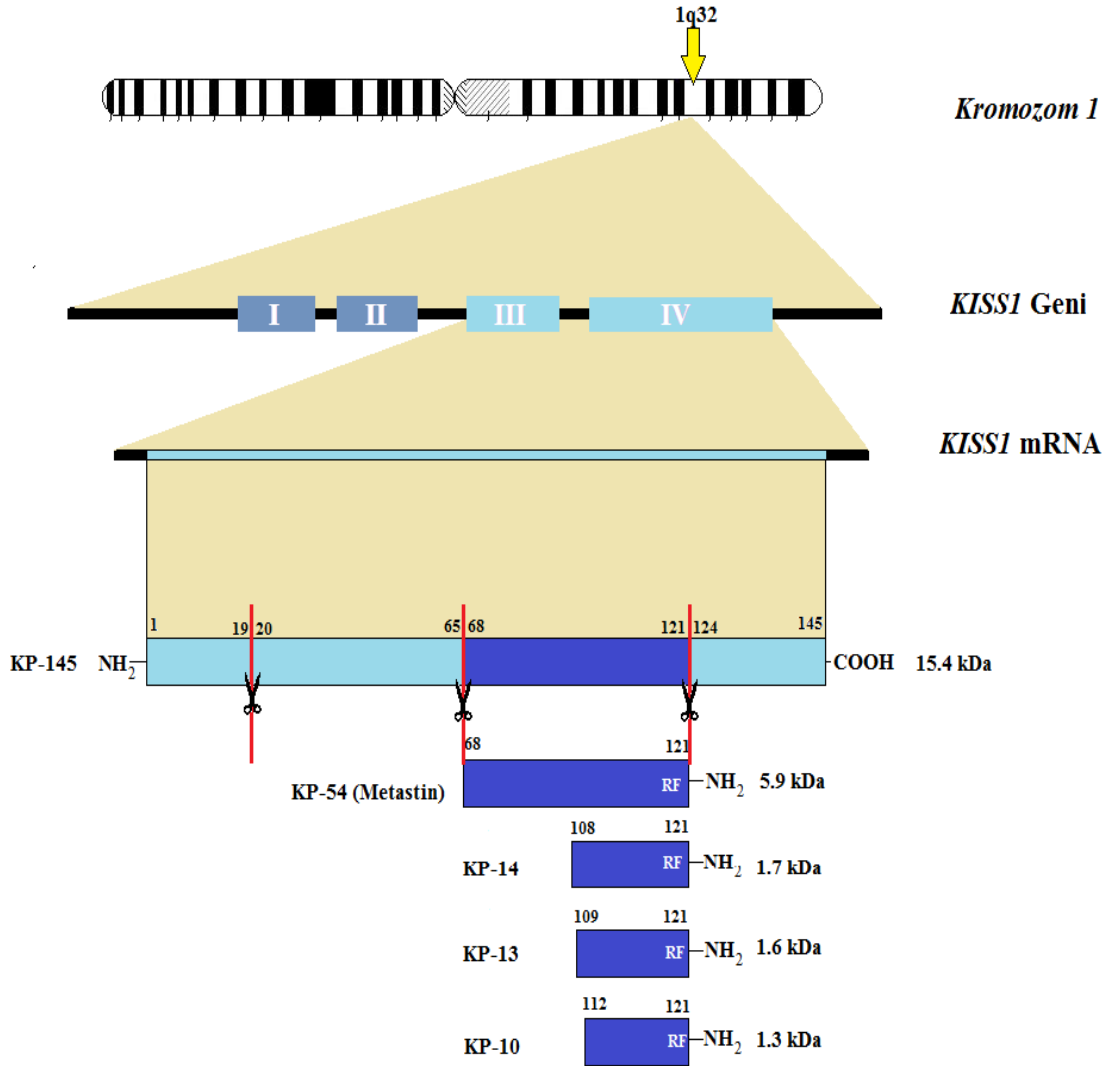
Kisspeptinler, *Kiss-1* geni (Gene ID: 3814) tarafından kodlanmaktadır. 1998 yılında yapılan çalışmada Kiss-1 geninin 1. kromozomun uzun kolunda (1q32) bulunduğu ve 2 kodlanmayan 2 kısmen kodlanan toplam 4 ekzondan oluştuğu bununla beraber insan genomunda 6.36 kilobazlık (kb) bir yer kapladığı gösterilmiştir (4).

Kisspeptinlerin hepsi, 145 amino asitlik (aa) pre-prokisspeptin (Kp-145)’ den kaynaklanır ve bazı kesim noktaları içeren bu öncül protein parçalanarak farklı sayıda aa içeren (Kiss-10, Kiss-13, Kiss-14 ve Kiss-54) fragmanlar oluşturur (Şekil 1). Metastin olarak da bilinen Kp-54 (54 aa) major olarak dokularda ve dolaşımda bulunur ve diğer kısa formların Kp-54’ün amino terminal (N terminal) ucunun kesilmesiyle oluştuğu düşünülmektedir. Kisspeptinlerin karboksil ucu RF motifi (Arjinin-Fenilalanin) denilen aa’leri içerir ve bu bölgeden amidleşirler (Arg-Phe-NH₂). Bu nedenle kisspeptinler, RF amid peptidler ailesinin bir üyesidir (5).

Kisspeptinler (Kiss-54, Kiss-14, Kiss-13 ve Kiss-10) biyokimyasal etkileri açısından incelendiğinde hepsi KISS1R’üne RF dizisinden yüksek afinite ile bağlanarak aktive etmektedir ve fizyolojik olarak en güçlü reseptör etkisi olan formu Kiss-10’dur ancak değişik türlerde bu durum farklılık gösterebilmektedir (2, 3, 6).

Kisspeptinin tam uzunluktaki öncül peptidinde ve KiSS-54’te bulunan KiSS-13 ve KiSS-10’da bulunmayan bir PEST (Prolin, glutamik asit, Serin ve Tironin bakımından zengin) dizisi içerir. Bu motif proteinlerin ubiquitinasyon ve proteozom yıkımına

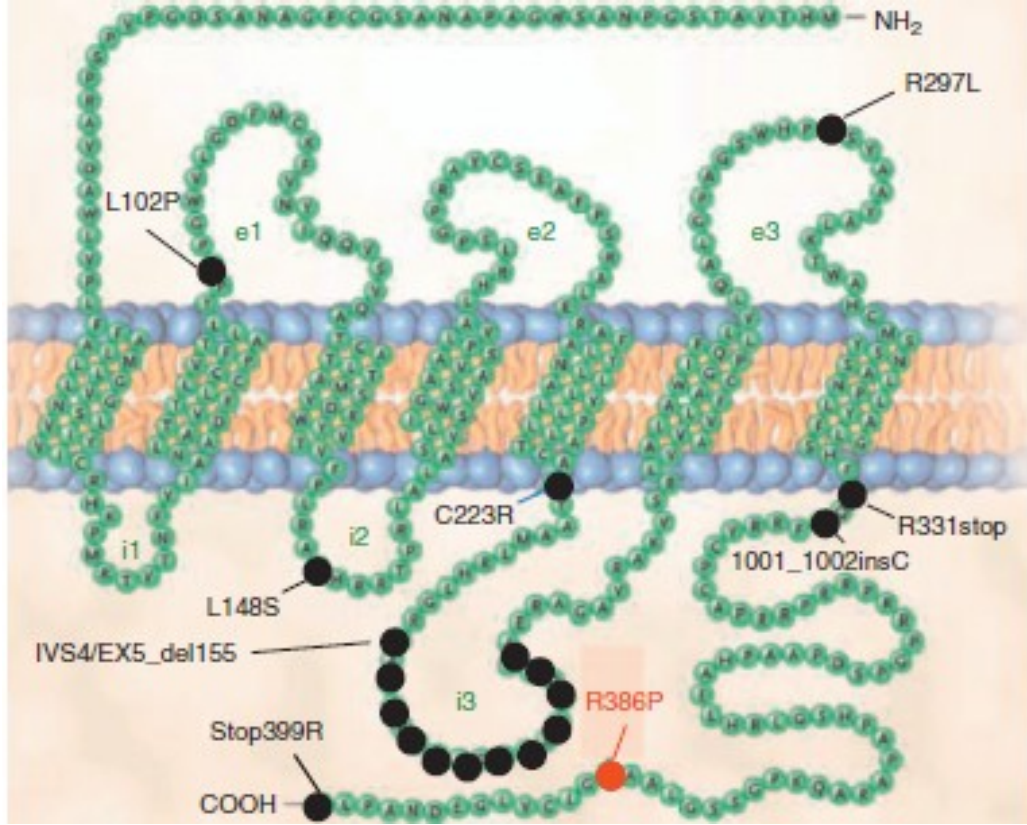
uğramasını kolaylaştırdığından sitozolik KiSS-145 ve KiSS-54'ün kısa bir yarı ömrü olduğu düşünülmektedir (7).



Şekil 1. Kisspeptin geninin kromozom üzerindeki lokasyonu, öncül kisspeptin-145'in sentezlenmesi ve aktif kisspeptinlerin oluşumu.

4.1.2 Kisspeptin Reseptörü (KISS1R, GPR54)

İnsan GPR54 geni 5 ekzon ve 4 introndan oluşur ve yaklaşık 3.5 kb büyüklüğündedir. Bu gen 398 aa, yedi transmembran domain olan bir reseptör kodlar (Şekil 2). Bu domainleri birbirine bağlayan üç hücre içi (i1, i2 ve i3), üçte hücre dışı (e1, e2 ve e3) yapıya sahip, Rodopsin ailesi üyesi (A sınıfı) G protein kapılı bir reseptördür (8). Reseptörün amino (–NH₂) ucu hücre dışında, karboksil (–COOH) ucu hücre içindedir. Galanin reseptörü ile % 30-40 homoloji göstermesine rağmen, ne galanin ne de galanin benzeri peptidler GPR54 reseptörüne bağlanmazlar. GPR54 reseptörü AXOR12 ve hOT7T175 olarak da isimlendirilir (3, 8).



Şekil 2 GPR54 reseptörünün şematik gösterimi. 7 transmembran domain, genetik olarak reseptörün aktivasyonunu etkileyen mutasyonlar siyah ve kırmızı noktalarla gösterilmiştir (Teles'den, 9).

Kispeptinin, uzun süre substratı keşfedilmemiş (orphan) reseptör olarak bilinen GPR54'ü (Sıçan) ve AXOR12'ü (insan) aktive ettiği gösterilmiştir (3, 8). Ancak isimlendirmeye bağlı karışıklığı önlemek amacıyla en yaygın kullanım GPR54 veya KISS1R olarak kabul edilmiştir.

Kispeptinin, GPR54 reseptörüne bağlanıp aktivasyonu ile hipotalamusta GnRH salınımını uyarıcı nöroregülatör bir sistem oluşturması bilim insanlarının bu konuda araştırmalar yapmaya yönlendirdi. Son yıllarda idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) hastalarında, GPR54 reseptörünü inaktive eden, fonksiyon kaybına neden olan delesyonlar ve nokta mutasyonları tanımlandı. Bu mutasyonların olduğu aa'ler şekil 2'de siyah noktalarla gösterilmiştir. Ayrıca idiyopatik santral erken puberte gelişen bir hastada GPR54 reseptörünün karboksil ucunda reseptörün fonksiyonunu arttırıcı bir mutasyon belirlendi (10). Bu mutasyonda Şekil 2'de kırmızı nokta ile gösterilmiştir. Bütün bu mutasyonlar dikkate alındığında GPR54 normal bir reproduktif fonksiyona geçiş için belirleyici, olmazsa olmaz zorunlu bir genetik role sahiptir (11).

Özellikle insan GPR54 geni GC (Guanin-Sitozin) bakımından zengin bir sekansa sahiptir. Bu sekans özelliği insan çalışmalarında gen çoğaltmayı zorlaştıran bir faktördür ve insan DNA analizleri için genellikle özel PZR koşulları gerektirir (12). GPR54 reseptörünün olası aa dizileri karşılaştırıldığında primatlar ve kemirgenler arasında % 80'in üzerinde homoloji dikkat çekmektedir. Bu, reseptörün çok iyi korunduğunu ve işlevsel olarak gerekliliğini göstermektedir (13).

4.1.3 Kisspeptin ve KiSS1R Hücrelerinin Lokalizasyonu

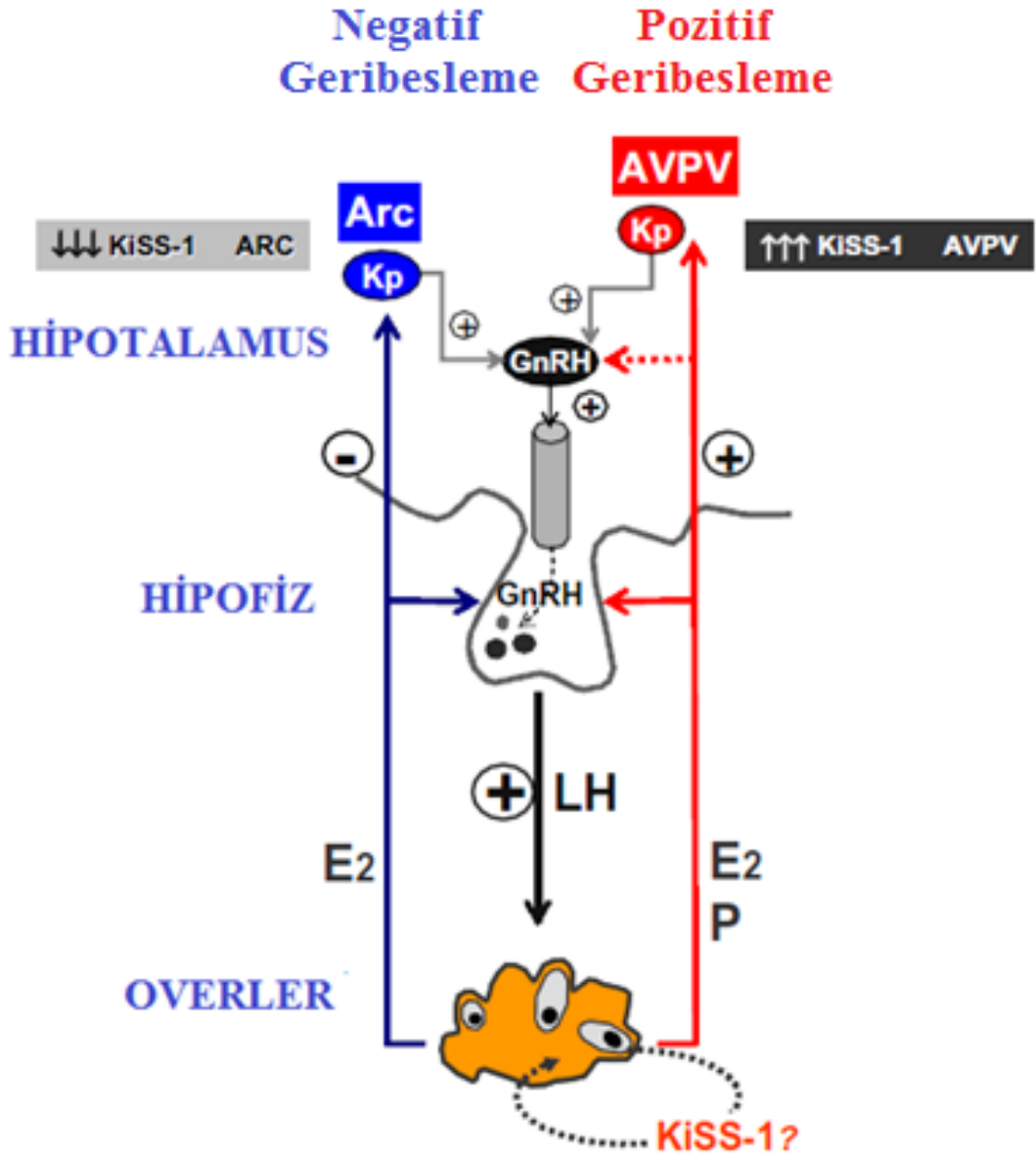
Kisspeptinin beyindeki ekspresyonuna bakıldığında özellikle GnRH salınımını kontrol eden arkuat nükleus, anteroventralperiventriküler (AVPV) nükleus ve periventriküler nükleus (PeN) bölgelerinde fazla olduğu gösterilmiştir (14). Bununla beraber bu peptidin ovaryum, testis, pankreas, barsaklar ve plasentada da ekspresyonu belirlenmiştir (15).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında kisspeptin ekspresyonunun erkeklerde testosteron ve dişilerde östradiol ile düzenlendiği belirlenmiştir (16, 17). Bu seks steroidleri arkuat nükleusta kisspeptinlerin ekspresyonunu ve sekresyonunu inhibe ederken, AVPV nükleusta ise indüklemektedir (Şekil 3). Bu çalışmalar doğrultusunda arkuat nükleus GnRH ve LH sekresyonu için negatif geribesleme, AVPV nükleus ise pozitif geribesleme merkezi olarak kabul edilir (16).

Dokular ve beyin bölgeleri incelendiğinde; pankreas, plasenta, omurilik, hipofizde; beyinde ise özellikle talamus, hipokampus, substansia nigra ve amigdala KISS1R mRNA'sının yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir (2, 3, 8). Amigdala'da GPR54 mRNA'sı özellikle medial nükleus ve kortikal nükleusta yoğun olarak sentezlenmektedir. Hipokampusta ise dentat girus'un granüler hücre tabakası, CA1 ve CA3'ün piramidal hücrelerinde GPR54 mRNA'sı yoğun olarak bulunmaktadır (8).

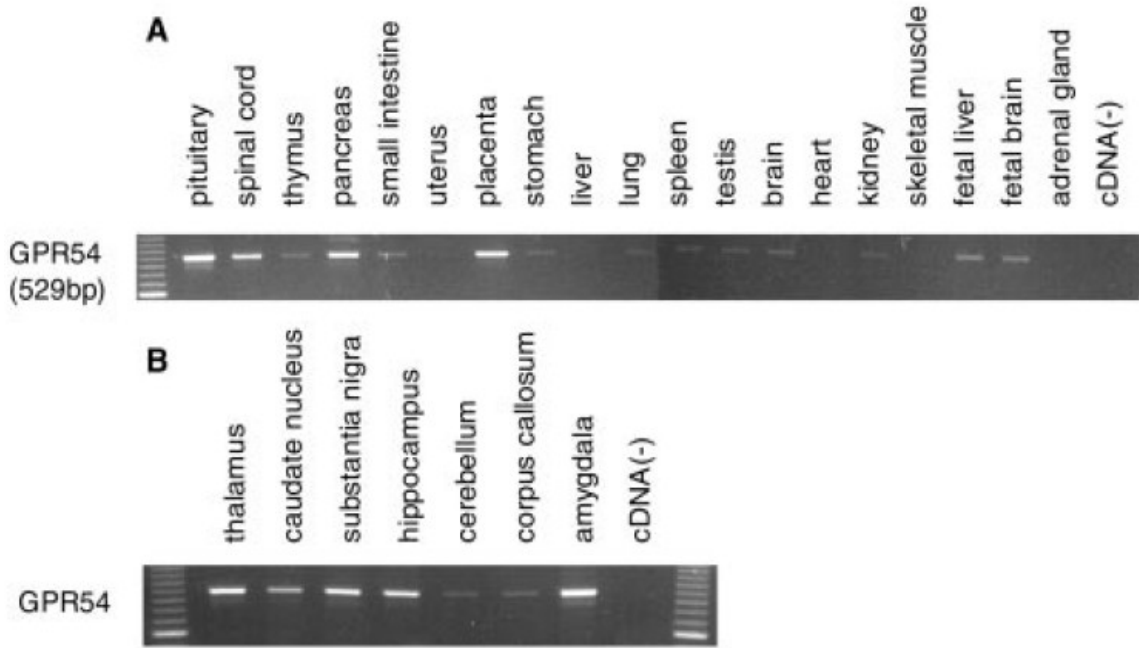
İnsan GPR54 reseptörünün kalp, kas, böbrek, karaciğer, bağırsaklar, timus, akciğerler ve testiste de düşük miktarlarda sentezlendiği bilinmektedir (3, 8).

GPR54 vekisspeptin sisteminin beyinde belli bölgelerde daha fazla ifade olması seçici fonksiyonlarda görev aldığını düşündürmektedir (18). Arai ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada dentat girus granül hücrelerinde in vitro ortamda tüm hücre kayıt yöntemiyle kisspeptinin istirahat membran potansiyelini değiştirmediği,

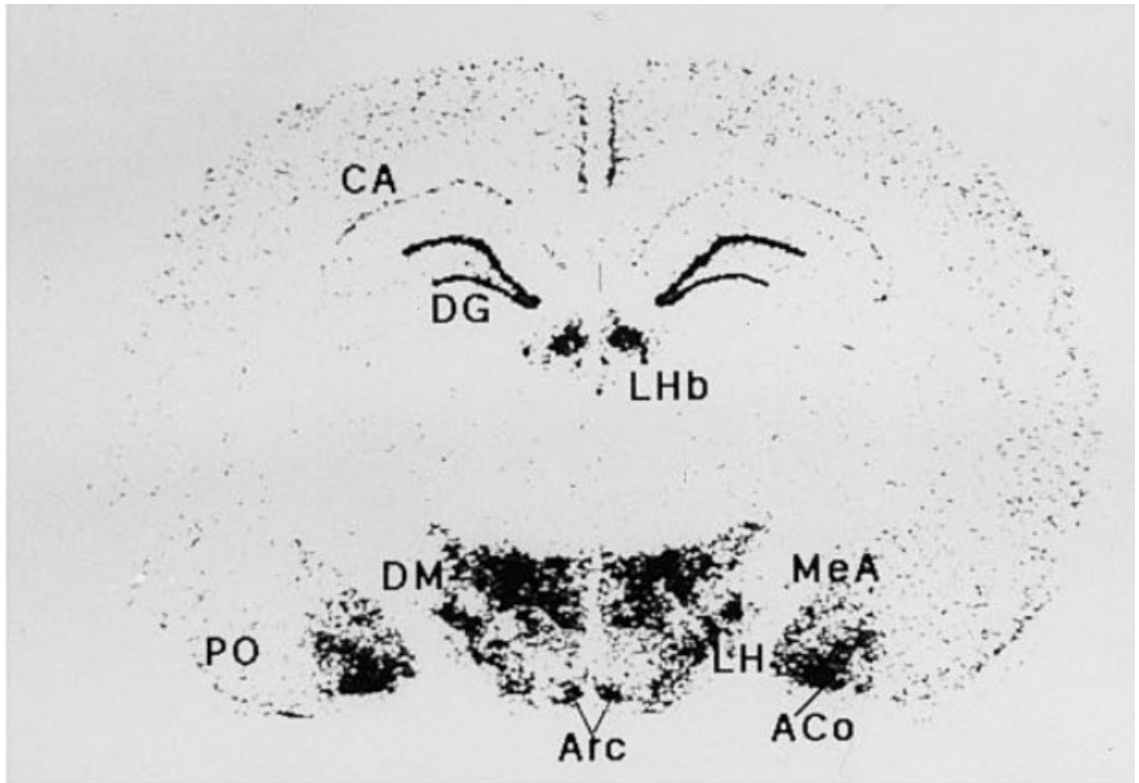


Şekil 3. Seks steroidlerinin kisspeptin ekspresyonuna olan etkileri. Arkuat nükleus, GnRH ve LH sekresyonu için negatif geribesleme; AVPV nükleus ise pozitif geribesleme merkezi olarak kabul edilir. (Roa'dan değiştirilerek alınmıştır 13).

ancak eksitator postsinaptik akım (EPSC) genliğini birkaç dakika içinde % 60-80 oranında artırdığını göstermişlerdir (19). GPR54 reseptörlerinin kisspeptin ile uyarılmasının glutamat salgılanmasını, AMPA reseptörlerinin sayısını veya kanal geçirgenliğini artırdığı ileri sürülmüştür (20). Kisspeptinin dentat girusta etkilerini postsinaptik membran elektrofizyolojisini modüle ederek gösterdiğine inanılmaktadır.



Resim 1. GPR54 reseptörünün insan dokularında ve beyin bölgelerindeki mRNA sentezini gösteren jel görüntüsü. (Kotani'den, 2)



Resim 2. GPR54 reseptörünün sıçan beyin bölgelerindeki dağılımını göstermektedir (Lee'den, 8).

Kisspeptinin etkilerini konu alan araştırmalar ağırlıklı olarak hipotalamus ve üreme fonksiyonları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kisspeptinin hipokampustaki etkinliği, öğrenme ve hafıza üzerindeki rolü ile ilgili bilgilerin çok sınırlı olması, bu projenin tasarlanmasını zorlaştıran ancak, bu projenin özgün değerini arttıran faktörlerden biri olarak görünmektedir.

In situ hibridizasyon çalışmalarıyla kisspeptin reseptörü GPR54'ün hipokampus, amigdala ve limbik sistemde yoğun olarak eksprese edildiği (Şekil 5) gösterilmiştir (2, 8, 21). Hipokampusta GPR54 mRNA ekspresyonu dentat girusta yoğunlaşırken, CA1 ve CA3 alanlarındaki piramidal hücrelerde sayıları oldukça azdır (8). Bu bilgiler, kisspeptin-GPR54 sisteminin beyinde seçici bir dağılım gösterdiğini kanıtlamaktadır. Ancak, hipokampustaki kisspeptin/ KiSS1R sisteminin fonksiyonu henüz araştırılmamıştır.

4.2 Kisspeptin ve KiSS1R Sisteminin Fizyolojik Etkileri ve Aktivasyonu

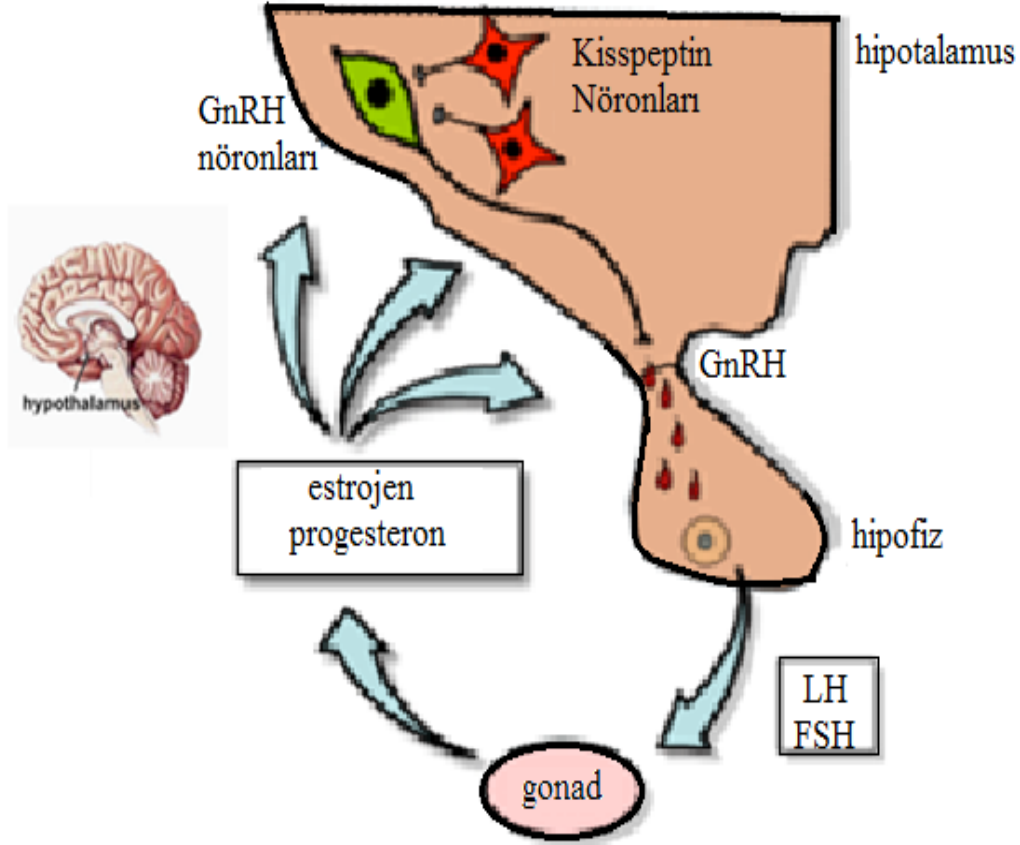
Periferik veya santral uygulanan kisspeptin, hipotalamik-hipofizer-gonadal eksenini uyarır ve gonadotropin miktarını artırır (17, 22, 23). Dolayısıyla üreme sistemi kisspeptin için önemli bir etki alanıdır. KiSS1R geninin delesyonu ile oluşturulmuş mutant farelerde yapılan bir çalışmada püberteye geçişin olmadığı gözlemlenmiştir (24) ve IHH hastalarında yapılan tarama sonucu hastalık ile KiSS1R mutasyonu ilişkisi gösterilmiştir (25). Bu çalışmalar fareler ve insanlarda KiSS1R'nin püberteye geçişte önemli bir geçiş molekülü olduğunu göstermektedir.

KiSS1R'nin beyindeki ekspresyonuna bakıldığında özellikle GnRH nöronları üzerinde yer aldığı gösterilmiştir (26). Bu şekilde kisspeptin / KiSS1R sistemi, GnRH salınımını doğrudan uyarır (27).

Hipotalamusta GnRH salınımını kontrol eden bölgelerdeki nöronlarda bulunan KiSS1R'ü kisspeptinler ile uyarıldıktan sonra aktif hale gelen sinyaller, Mediyana eminenden portal hipofizel dolaşıma GnRH salınmasını sağlarlar. Bu nörohormon da hipofiz gonodotrop hücrelerde bulunan GnRH reseptörüne bağlanır ve FSH/ LH salınımını sağlar (Şekil 6).

Kisspeptinlerin karboksil gruplarında bulunan Arg-Phe-NH₂ motifi, GPR54 reseptörüne bağlanmadan sorumlu olan kısımdır. Kisspeptinlerin reseptöre bağlanmasıyla beraber hücre içinde sinyal yolları aktive olur (Şekil-7). Bu hücresel

aktivasyon ile hormon sekresyonu, metastaz, proliferasyon, migrasyon üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir (29, 30, 31).

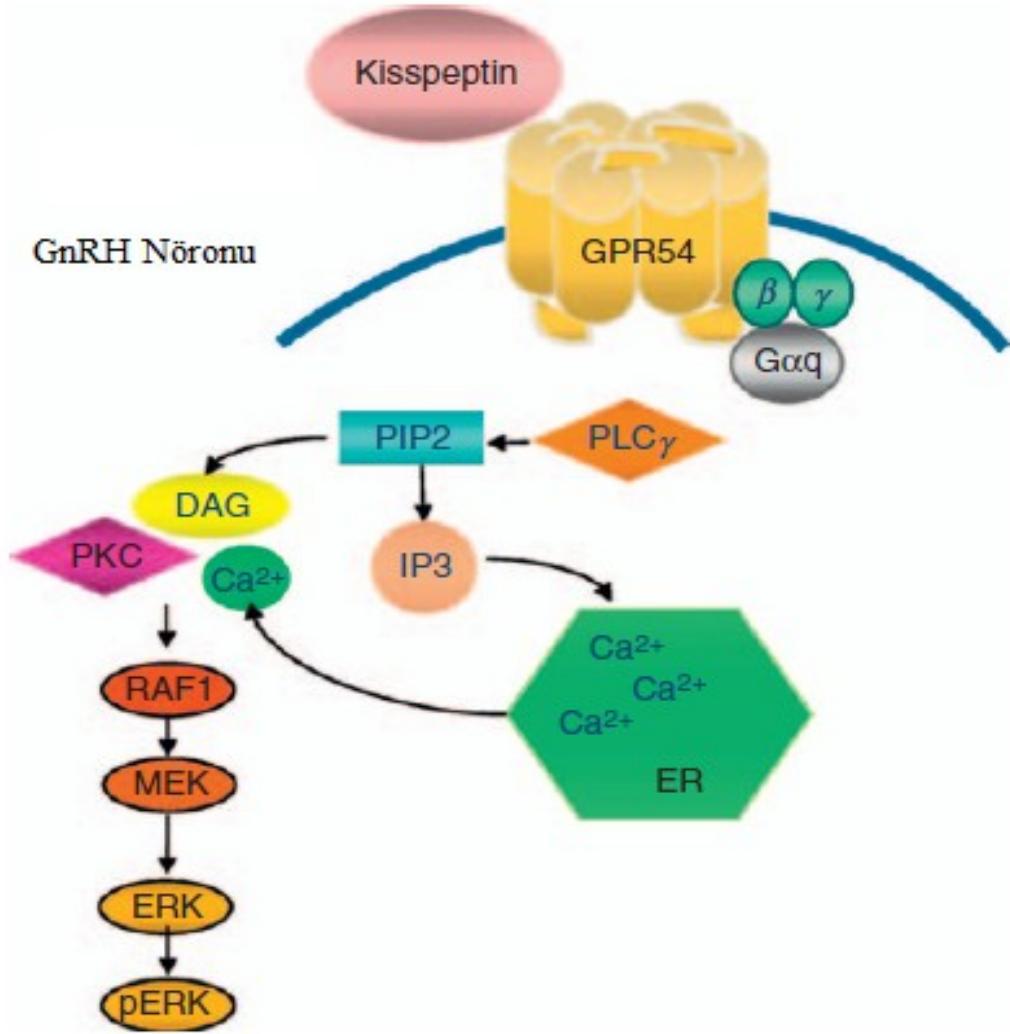


Şekil 4. Kisspeptinin GnRH nöronları üzerine etkisinin şematik gösterimi (Kaynak (28)'den değiştirilerek alınmıştır.)

Reseptör ligand bağlanmasını takiben (Şekil 7) Gαq/11 yolağını kullanarak, fosfolipaz-C (FLC) aktive olur ve hücre içinde PIP2 hidrolizi ile inositol-1,4,5- trifosfat (IP2) miktarını artırır. Bu değişim hücre içi depolardan Ca^{+2} salınımını artırır. İntrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı ile iyon kanallarının geçirgenliği değişir (örneğin hücre dışına K^{+} çıkışı bloklanır) ve Protein kinaz C (PKC) aktive olur. Bu mekanizmayla ERK fosfarilasyonunu arttırıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (2, 3, 6, 32).

ERK proteinlerinin birincil fonksiyonu transkripsiyonu aktive etmek olsa da, potasyum kanalları, sinapsin ve NMDA gibi proteinleri fosforile ederek nöronal fonksiyonlar üzerine direk etkiye sahiptir (33, 34, 35, 36). İlginç bir şekilde kisspeptin mitojen aktive protein kinaz (MAP Kinaz) aktivasyonunu indükler. MAP Kinaz yolağı,

hücre döngüsü ve proliferasyonu kontrol etmesine rağmen, kisspeptin uyarımı hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır (29). MAPK yolağının aktivasyonu, kisspeptinin GnRH nöronları üzerine olan etkisi için gereklidir. MAPK yolağının bloklanması sonucu kisspeptin bağımlı GnRH sekresyonunun baskılandığı “ex vivo” bir çalışmada gösterilmiştir (29).



Şekil 5. KISS1R ve ligandının GnRH nöronları üzerindeki hücresel aktivasyonu. PLC: Fosfolipaz-C, PIP2: Fosfatidilinositol, IP3: inositol tri fosfat, PKC: protein kinaz-C DAG: diasil gliserol, RAF1 ve MEK: serin/trionin spesifik kinaz, ERK: ekstrasellüler regüle edilen kinaz, pERK: fosforile olmuş ERK, ER: Endoplazmik retikulum. (Teles'den değiştirilerek alınmıştır 10)

Tablo 1. Kisspeptin ve reseptörünün karakteristik özellikleri

Özellikler	KISS1R	KISS1
Proteinin Alternatif isimleri	KiSS-1 reseptör Kisspeptin reseptör Metastin reseptör GPR-54	Metastasis-suppressor KiSS1, Kisspeptin-1 <u>Kırılma ile 4 farklı protein oluşur:</u> 1. Kisspeptin-54 2. Kisspeptin-14 3. Kisspeptin-13 4. Kisspeptin-10
Genin İsimleri / Sinonimleri	KISS1R / AXOR12, GPR54	KiSS1
Moleküler Sınıfı	G protein kapılı reseptör	Peptid ligand
Amino asit sayısı	398 aa (insan) 396 aa (sıçan, fare)	138 aa (insan) 130aa (sıçan, fare)
Moleküler Ağırlığı (kDa)	42,586 kDa	5,9 kDa (Kp-54), 1,7 kDa(Kp-14), 1,6 kDa(Kp-13), 1,3 kDa (Kp-10)
Kromozom lokalizasyonu	19p13.3	1q32
Hücresel lokalizasyonu:	Hücre membranı, Membranı çoklu geçen protein	Salgılanan protein
Türlerdeki gen taraması	<i>Homo sapiens</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q969F8) <i>Rattus norvegicus</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q924U1) <i>Mus musculus</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q91V45) <i>Danio rerio</i> (UniProtKB/Swiss-Prot A8CAH3)	<i>Homo sapiens</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q15726) <i>Rattus norvegicus</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q7TSB7) <i>Mus musculus</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q6Y4S4) <i>Danio rerio</i> (UniProtKB/Swiss-Prot A8C5J1)

4.3 Aromataz (Östrojen Sentaz) Enzimi

Aromataz diğerk bir adıyla östrojen sentaz, östrojen biyosentezinde anahtar rol oynayan bir enzimdir. Sitokrom P450 ailesinin bir üyesidir. Bu enzim androstenedionu östrona ve testosteronu östradiole katalizler. Aromataz enziminin overler, plasenta, hipotalamus, karaciğerk, kas, yağ doku ve kanserleşmiş meme dokusu dahil olmak üzere birçok organda üretimi meydana gelmektedir (37, 38). Bu enzimin üretimi sitokinler cAMP, gonadotropinler, büyüme faktörleri ve glukokortikoidler gibi birçok faktörün kontrolü altındadır (39).

4.3.1 Östrojen Biyosentezi

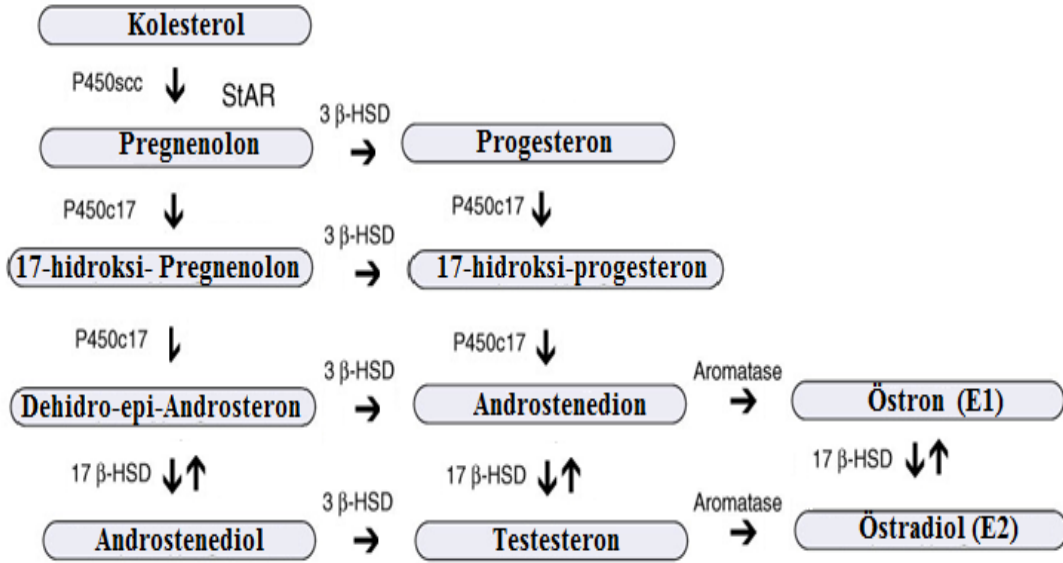
Aromatazın östrojen sentezi için substratı androstenedion ve testosterondur. Östrojenler başlıca overlerde, böbrek üstü bezlerinde, plasentada ve testislerde ve lokal olarak da beyinin bazı bölümlerinde sentezlenir ve FSH tarafından uyarılır.

Östrojenler kanda özel bir taşıyıcı proteine bağlanarak taşınır ve en etkilisi östradiol (E2)'dir ve daha az aktif olan östron (E1) ile dengededir. Etkisi en zayıf olan ve östrondan oluşan östriol (E3)'da gebelerin idrarında ve plasentada bulunur. Östrojenler idrarla atılırlar.

Gonadal steroidlerin önemli hedef organı olmasının yanı sıra beyin lokal olarak da östrojen sentezinin yapıldığı bir organdır (42, 43). Her iki cinsiyette de aromataz enziminin beynin bazı bölgelerinde androjenleri östrojenlere çeviren bir enzim olduğu bilinmektedir (44). Normal koşullarda bu enzim beyinde sadece MSS nöronlarında sentezlenmektedir (45). Farklı tipte beyin hasarlarında astrositlerdeki aromataz enzimi sentezi artmaktadır (46).

4.3.2 Aromataz İnhibisyonu ve Letrozol

Letrozol, FDA'nın yakın zamanda onayladığı aromataz inhibitörlerinden biridir. Letrozol; non-steroid yapıda, oral olarak uygulanan, aromataz enziminin hem bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanarak östrojen sentezini inhibe eder (40). Aromataz inhibitörlerinin etkinliğinin in vivo ölçüm metodu genç sıçanlarda androstenedionun uyardığı uterus hipertrofinin inhibisyonunun gösterilmesidir. Yetişkin dişi sıçanlarda yapılan bir çalışmada letrozol (0.3-1 mg/kg günlük oral, 14 gün) uygulaması tamamen overiyen siklusu bozduğu (kestiği), uterus ağırlığında ve serum östradiol seviyesinde ovariectomiden sonraki miktarlara benzer düşüşler yaptığı gösterilmiştir (48).



Şekil 6. Merkezi sinir sisteminde östrojenlerin sentez basamakları Androjenlerin Östrojenlere çevrilimi gösterimi (Garcia-Segura'dan değiştirilerek alınmıştır (49).

Klinikte hormon bağımlı kanser ve endometriyozis tedavisinde kullanılmaktadır (41). Aromataz enziminin yetersizliğinde hem kadınlarda hem de erkeklerde üreme fonksiyonlarında önemli problemler meydana gelir. Tamamen aromataz fonksiyonundan yoksun kadınlarda genital belirsizlik ve adölesan dönemde erkek aromotaz knockout (ArKO) farelerde testiküler dejenerasyon bulunmuştur ve erkeklerde osteopeni ile birlikte epifiz kapanmasında yetersizlikler ve anormal kemik gelişimi izlenmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar prefrontal kortekste noradrenalin ve dopamin salınmasındaki artış ile mekansal (uzaysal) işlek bellek arasında pozitif bir ilişki olduğu yönündedir (47). Aydın ve ark. yapmış oldukları çalışmada doz bağımlı olarak letrozol uygulamasının noradrenalin hipokampüste azalttığını korteks ve striatumda arttırdığını, benzer şekilde dopamin konsantrasyonunun hipokampüste azaldığını striatumda ve hipotalamusta arttığını ve ilişkili olarak östrojen sentez inhibisyonunun Morris su labirenti testinde uzaysal hafızayı (özellikle pekiştirmeyi) olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir (48).

Letrozol güçlü bir şekilde östrojen üretimini azaltırken (IC50 0.02µM), en yüksek konsantrasyonlarda bile (350 µM) kortikosteron veya progesteron azaltıcı etkisi hiç yoktur ve aldosteron inhibisyonu için IC50 değeri 120 µM olması gerekmektedir.

4.4 Öğrenme ve Hafıza

4.4.1 Tanımı

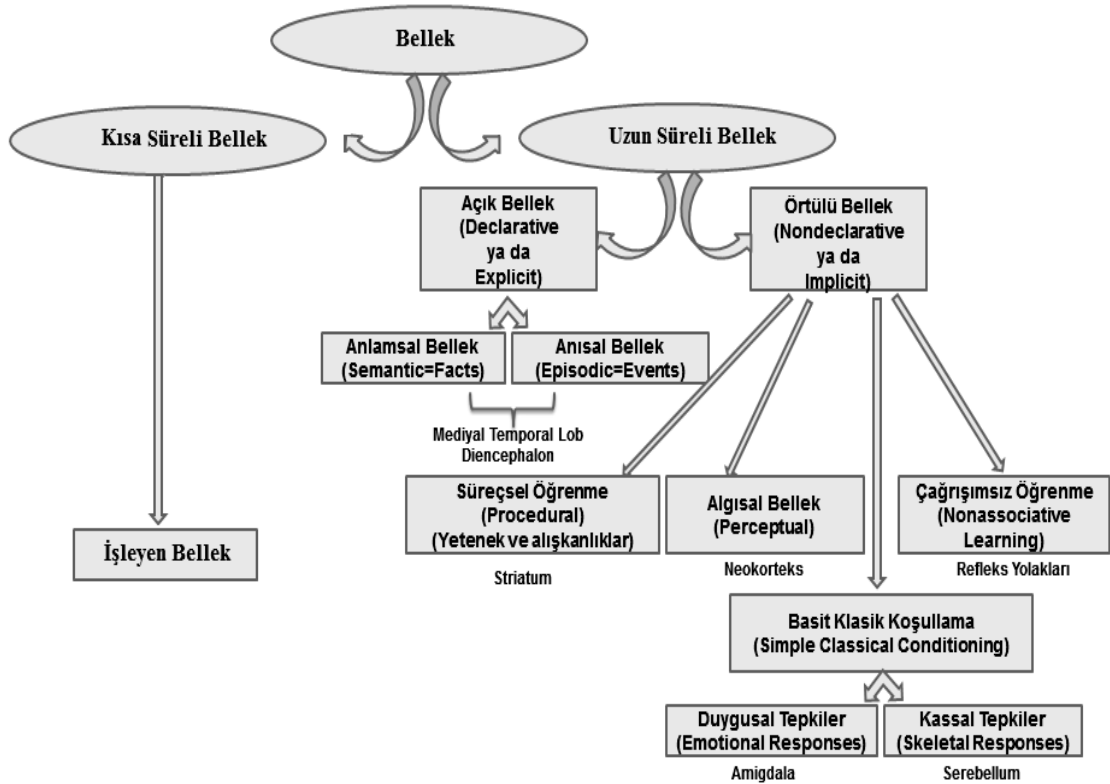
Öğrenme bireyin deneyimler sonucunda davranışlarında meydana gelen kalıcı değişimler ve bilgiyi kazanabilme yeteneğidir. Hafıza (bellek) ise uzun süreli öğrenilen bilginin, verinin MSS içerisinde depolanması ve korunmasıdır. Öğrenme ve hafıza, canlılar için sürekli değişen çevre koşullarına adapte olmayı mümkün kılan, daha az çabayla ve daha az tehditle kaynaklara ulaşımı kolaylaştıran yaşam boyu devam eden süreçlerdir. Sinirbilimciler öğrenmeyi “dünya hakkında davranış etkiler biçimde bilgi edinmek” olarak tanımlarlar (50).

Öğrenme ve hafıza; deneyimleri, bilgileri kaydedip daha sonra tekrar ortaya çıkarmaya yarayan bir sistemdir ve bu sistem insanlarda ve hayvanlarda çevreye karşı davranışları belirleyen en önemli faktörlerdendir. Hafızanın oluşumu için beynin birçok bölgesi görevlidir. Hipokampus, korteks ve limbik sistem gibi birçok önemli merkez bilginin öğrenilmesi ve hafızaya alınması için aktive olur.

Genel hatlarıyla kabul gören hatırlama sürelerine göre hafıza üç ana sınıfa ayrılır: anlık/duyusal bellek, kısa süreli bellek (STM) ve uzun süreli bellek (LTM) (51, 52). Duyusal bellek, duyulan seslerin veya görülen nesnelerin anlık (sadece birkaç saniye) hatırlanmasıdır ve bazı teoriler yaklaşık 300 milisaniye olduğunu bununla beraber sınırsız bir kapasitesi olduğunu ileri sürmektedir (51). Kısa süreli hafızada duysal hafıza ile elde edilen bilginin bir kısmı yaklaşık bir dakika kadar çağrılıp hatırlanabilir. Özellikle tekrar edilen kelimeler sıklıkla bir ses gibi ya da resim olarak saklanır. Temelde bir bilgisayar RAM (rastgele erişimli hafıza)’i ile aynı olarak düşünülebilir. Bilgisayar RAM’i küçük hesaplar için bir çalışma alanı oluşturur ve sonra bilgiyi hafıza sistemine transfer eder veya siler. Bu bilginin yaklaşık 7 bit olduğu düşünülüyor, bazı teoriler normalde 7 parça hatırlanabildiğini savunur (51, 53). Bu nedenle kısa süreli hafızada karışıklık ve kesinti oldukça olağandır. STM’de akustik kodlama kullanılır ve nöron grupları arasında ileti devreleri bulunur. Örneğin telefon numarası gruplara ayrılarak incelendiğinde bir dakikaya kadar hatırlanabilir yani telefon defterine bakıldığında numara ancak çevrilene kadar hatırlanır (51). Kısa süreli hafızada işlem

kapasitesi çok kısıtlı olmasının nedeni yeni bilgiler eklendikçe eskilerin silinmesidir. Uzun süreli saklanacaksa hipokampüste bir süre daha depolanır, buradan uzun süreli belleğe gönderilir (51). Uzun süreli hafızada ise diğerlerine nazaran depolama kalıcıdır. Bilgi, önemi ve anlamı temel alınarak kodlanır ve depolanır. Kapasite sınırlaması yoktur ve nöronal kalıcı bağlantılar gerektirir (plastisite) (51). Tekrar edilerek ezber yoluyla uzun süre hatırlanır duruma gelir. Örnekteki telefon numarası tekrar yoluyla ezberlenir ve uzun süre saklanır.

Belleğin belli kıstaslara göre sınıflandırılması ve bu bellekle ilgili işlemleri yürüten beyin bölgesi Tablo 2’de özetlenmiştir. Uzun süreli bellek, açık ve örtülü olmak üzere iki ana başlıkta toplanır.



Şekil 7. Hafızanın sınıflandırılması (Paul'den değiştirilerek alınmıştır 54)

Açık bellek (deklaratif), doğrudan doğruya bilinçli erişime açık olan ve olgulara, kavramlara, olaylara ilişkin bilgileri (başkalarına bildirilebilecek, anlatılabilecek bilgileri) içeren bellek türüdür. Açık bellek, anısal (epizodik) bellek (örn. 17 Ağustos Depremi olduğu anda nerede olduğunuzu veya ne yaptığınızı hatırlayabilirsiniz gibi kendi başından olayları hatırlama) ve anlamsal (semantik) bellek (örn. Ankara,

Türkiye'nin başkentidir gibi dünya ile ilgili bilgileri bilme) olarak kendi içinde iki alt sınıfa ayrılır.

Örtülü bellek ise, söze dökülemeyen, sözlü olarak iletilmesi gerekmeyen algısal ve motor kapasiteler hakkındaki bilgileri göstermektedir (54). Gerçek anlamda bir bellek değildir (kişi bildiğinin farkında değildir) ve hatırlama işlevi yoktur. Belleği farkında olmadan bir uyaran bulunması kişinin sonraki davranışlarını değiştirmesine yol açar, bu nedenle örtülü bellek olarak adlandırılır. Bu bellekte kişi belli bir şekilde davranmaya hazır hale gelir. Sözlü anlatım kıstaslarına göre bazı kaynaklarda örtülü belleğe “bildirimsel olmayan bellek”, açık belleğe ise “bildirimsel bellek” denilmektedir.

4.4.2 Epizodik (Olaysal) Bellek

Açık belleğin bir bölümü olan Epizodik (olaysal) bellekte; kişinin kendi başından geçen olay, yer ve zaman birlikte kaydedilip örüntüler oluşturulur. Epizodik bellekte “olayı ne zaman, nerede, kimden öğrendin, öğrendiğinde kaç yaşıydın, nasıl öğrendin” gibi bilgileri hatırlanır. Semantik bellekte öyküselden farklı olarak yer ve zaman bilinmez, bunların kaydı yoktur. Provanın veya tekrarın hemen hiç olmaması nedeniyle, anlamsal belleğe göre daha kolay unutulmaya elverişlidir, ancak duygularla, özellikle de yoğun duygularla ilişkilenebilir halinde anlamsal bellekten çok daha kalıcı izler oluşturabilir.

Bildirimsel (açık) belleğin bir alt türü olan epizodik belleğin içeriği geçmiş olaylar ile kısıtlanmamıştır. Geçmiş olaylar ve deneyimlere dayanarak kodlanan bilginin bugünkü ya da yakın geleceğe ait planlarla birleştirilerek tekrar yapılandırılmasını da içermektedir. Epizodik bellek, büyük ölçüde medial temporal lob (MTL)’a konumlanmıştır. Yapılan çalışmalar bilginin kazanılması ve saklanması için MTL’nin gerekli olduğunu gösterirken, prefrontal korteksin aktivasyonu ise özel bir bilgiyi arama sırasında, bir olayı izlerken, bir olay veya seçimden bir çıkarım yaparken gözlenir (55, 56). Ayrıca bir hedef seçme ve çeşitli alt hedefleri araştırma, hedefe ulaşmak için planlar belirleme ve davranışsal kontrol ve gözlem prefrontal korteks aktivasyonu ile eş zamanlı oluşur (55, 57, 58, 59).

Prefrontal korteks en fazla karar verme ve kısa süreli hafıza üzerindeki rolü ile bilinir. Aynı zamanda limbik sistemin bir parçası olan prefrontal korteks güncel uyarılara karşı oluşturulan gerekçeli davranışların (açlık veya korku gibi öğelerle

motive edilmiş) adaptasyonunda da görevlidir. Örneğin etrafta yiyecek yoksa enerjiyi korumak adına yiyecek aramaya çalışılmaması ya da korku nedeniyle mezarlıktan gece geçilmemesi.

Uygun davranışsal görevler ve hayvan modellerinin birleştirildiği çalışmalar tasarlanarak kognitif fonksiyonlar ve davranışsal özellikleri incelemek epizodik belleğin temelinde yatan nöranal sübstratların araştırılmasında kullanılabilir.

4.4.3 Mekansal Bellek ve Morris Su Labirenti Testi

Mekansal bellek epizodik bellek ile ilişkilidir. Bütün hayvanlar özellikle yeni bir ortama girdiklerinde mekânı inceleme eğilimindedirler. Yiyecek, sığınak ve güvenli bir yer arayışına girerler. Bu insan dâhil tüm türlerde yüksek oranda korunmuş, içgüdüsel bir davranıştır. Böylece mekansal hafıza, hatırlamak, kodlamak, saklamak, nesnelerin veya özel rotanın düzenlenmesi ile ilgili mekansal bilginin tekrar hatırlanmasından sorumlu olan beyin fonksiyonları olarak açıklanabilir (60).

Kemirgenlerin mekansal belleklerdeki uzun süreli hatırlama yetenekleri genellikle zayıftır ve bu nedenle bellek ölçümü yeniden kazanma stratejisinin kullanılmasını gerektirmektedir. Bellek geri çağırımı, hatırlanacak ve geri çağırılacak madde ile ilişkili ek ipuçlarının yardımıyla olmaktadır.

Mekansal öğrenme ve hafıza analizleri için en yaygın kullanılan testlerden birisi Morris su labirenti (MSL) testidir. Bu test 1981 yılında Richard G.M. Morris tarafından öğrenme ve hafıza testleri için alternatif bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır ve bu test sıçanlardaki mekansal bellekte proksimal ve distal işaretlerin rolünün değerlendirilmesini mümkün kılmıştır. Bu test sırasında tankın içinden sıçanların görebileceği şekilde etrafa bir takım şekiller içeren işaretler asılır. Test sonuna kadar bu işaretlerin yeri ve gizlenmiş platformun yeri değiştirilmez (61, 62).

MSL, deney hayvanlarını olaylar ve çevreleri arasında sistematik ilişkiler kurmaya zorlar. Bu testte öncelikle motivasyonu sağlayan sıçanın sudan bir an evvel kurtulmak istemesidir. Daha önceden edindiği deneyim ile “platforma çık” kararını vermesi, platform nerde diye düşünerek mekansal belleği kullanması, bir önceki tecrübesini hatırlayıp platforma doğru yüzmesi kısa süreli belleği kullanmasını yani hipokampusün sürekli korteks ile ilişki içinde olmasını gerektirir.

MSL testinde değerlendirme yapılırken dikkat edilmesi gereken yüzme hızının çeşitli faktörler nedeniyle farklılık gösterebileceğidir. Vücut ağırlığı, fiziksel kondisyon

ve yaş bunlardan en önemlileridir. Yapılan birçok araştırmaya göre, ratlarda yaşa bağlı olarak uzamsal hafıza yeteneklerinde belirgin bir azalma görülmektedir (63, 64). Test uygulanırken bu tür farklılıkların gözden geçirilmesi gerekir.

MSL testinde gizli platformu bulma sırasında uzaysal öğrenmeden sorumlu olan birincil yer hipokampüstür. Pekiştirme ve depolamada olduğu gibi mekansal bilginin alınması ve kazanılması için hipokampus gereklidir.

4.4.4 Hipokampus

Hipokampusun deklaratif (bilgi), episodik (zaman) ve spasiyal (mekansal) hafızanın oluşması ve pekiştirilmesinde önemli rolü olduğu kabul edilmektedir (65, 50, 51). Limbik sistemin bir parçası olan hipokampusun kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçişi sağladığı da bilinmektedir.

Genel olarak bakıldığında belleğin mekanizması tam anlamıyla anlaşılamamış olsa da mekanizma ne olursa olsun sağ ve sol hipokampus olmadan verbal veya sembolik uzun süreli anıların kalıcı olması yani bilginin uzun süreli belleğe çevrilmesi mümkün değildir.

Yapılan deneylerde geri dönüşümlü olarak hipokampus inaktivasyonunun MSL testinde performansı bozduğu gösterilmiştir (65, 66). Hipokampusu etkileyen lezyonu olan sıçanlarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmediği gözlenmiştir. Lezyonun sol hipokampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda ise görsel hafıza etkilenmektedir. Sıçanlarda MSL testi özellikle hipokampal lezyonların etkilerine duyarlıdır. Uzaysal öğrenme hipokampal hasarın boyutuyla ilişkili olarak bozulmaktadır ve dorsal hipokampal lezyonların ventral olanlardan daha fazla etkilediği rapor edilmiştir (65, 66).

Hafıza ile ilgili moleküler araştırmaların temeli genellikle edinimin altında yatan mekanizmalara odaklanmıştır. Bu odak, büyük oranda uzun süreli kuvvetlendirme (LTP) gibi sinaptik plastisite formları dâhil, hücrel öğrenme modellerinin başarısı nedeniyledir. Hafıza birikiminin hücrel bir mekanizması olarak, LTP'nin rolü hakkında cevaplanmamış birçok soru olmasına karşın, LTP çalışmasının potansiyel olarak bellek depolamasının altında yatan moleküler mekanizmaları tanımlamak ve karakterize etmek için bir yol sunduğu açıktır.

Kisspeptin ve GPR54 reseptörlerinin hipokampus ve kortekste eksprese edildikleri gösterilmiştir (8). Ancak, bugüne kadar kisspeptinin öğrenme ve hafıza gibi kognitif

fonksiyonlar üzerine etkileri araştırılmamıştır. Hipokampus, hipotalamus ve kortekste yoğun olarak eksprese edilen kisspeptinin, öğrenme ve hafıza gibi kognitif fonksiyonlar ile öğrenme, hafıza, hayvan aktivitesi, depresyon ve anksiyete gibi davranışlar üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Deney modelinde ayrıca beyin dokusunda sinyal iletim yolları (Erk1/2) ile NMDA reseptörüyle ilişkili olan post-sinaptik densite protein-95 (PSD-95) ve sinaptofizin (SYP)'in ifadeleri de incelenmiştir.

5 GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyler Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırmaları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney protokolü Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı.

5.1 Deney Hayvanları

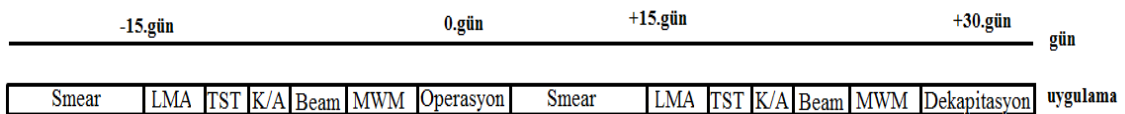
Deneylerde, ağırlıkları 200-250 gram olan, en az iki düzenli östrus siklusu gösterdiği vajinal *smear* yöntemi ile belirlenen Sprague/Dawley cinsi toplam 32 adet dişi sıçan kullandı. Uygulamalara başlamadan önce tüm sıçanların vücut ağırlıkları belirlendi. Gruplar, vücut ağırlık ortalamaları birbirlerine en yakın olacak şekilde 4 gruba ayrıldı (Tablo 2). Kontrol grubu ve letrozol gruplarında kullanılan ozmotik pompalara çözücü solüsyon olan serum fizyolojik, kisspeptin ve kisspeptin+letrozol gruplarında ise pompalara kisspeptin-10 (Sigma) konuldu. Letrozol ve kisspeptin+letrozol gruplarına 1mg/kg/gün letrozol oral olarak, kisspeptin ve kisspeptin+ letrozol gruplarına ise kisspeptin günlük doz 10 nmol olacak şekilde ozmotik pompa ile uygulandı. Deney hayvanları 21±1 °C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutuldular. Sıçanlara *ad libitum* olarak standart sıçan yemi ve normal musluk suyu verildi.

Tablo 2. Deney grupları

Gruplar (n=8)	ICV (ozmotik pompa)	Oral
Kontrol	Serum Fizyolojik	-
Letrozol	Serum Fizyolojik	Letrozol (1 mg/kg/gün)
Kisspeptin	Kisspeptin (10 nmol/gün)	-
Kisspeptin + Letrozol	Kisspeptin (10 nmol/gün)	Letrozol (1 mg/kg/gün)

5.1.1 Davranış Testleri

Tüm sıçanlar uygulamalardan önce rastgele gruplara ayrıldı ve aynı şartlar altında belirtilen davranış testleri uygulandı. Yapılan uygulamalar şekil 8'deki çalışma takviminde özetlenmiştir.

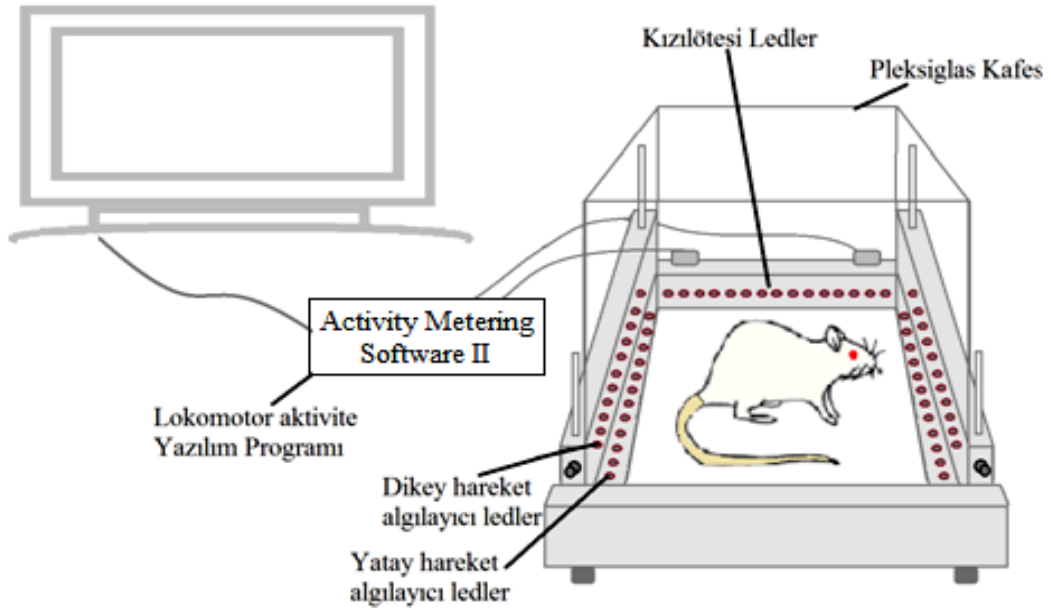


Şekil 8. Deneysel çalışma takvimi.

5.1.2 Lokomotor Aktivite Testi

Lokomotor aktivite, bir yerden başka bir yere geçme hareketini ifade etmek için kullanılır. Deney hayvanının lokomotor aktivitesi özellikle kullanılan ilaçların davranışlar üzerine etkilerini gözlemlemeye yardımcı olur. Psikofarmakolojide laboratuvar hayvanlarında spontane aktivitedeki değişiklikleri değerlendirmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Deneklerin agresifliğinin ve anksiyetesinin değerlendirilmesinde ayrıca ilaçların sedatif, kas gevşetici, psikostimülan etkilerinin belirlenmesinde kullanılır. Lokomotor aktivite ölçüm sisteminin esası her bir kenarı üzerinde kızılötesi (IR) ışık kaynakları içeren kare şeklinde bir dörtgendir. Bu dörtgenin içine sığacak büyüklükte kare şeklinde pleksiglas bir kafes yerleştirilmiştir.

Deney hayvanı kafes içinde bir hareket yaptığında karşılıklı IR sensörler arasındaki iletişimi keser ve bu deneğin yaptığı hareketin şekline göre cihaza bağlı bir kaydedici tarafından kaydedilir. Bu sistem (MAY, ACT 0804, Commat) kullanılarak sıçanların horizontal, vertikal ve ambulator aktivite kaydedildi.



Şekil 9. Lokomotor aktivite ölçüm cihazını temsilen çizilen düzenek. (Uzbay'dan değiştirilerek alınmıştır 70)

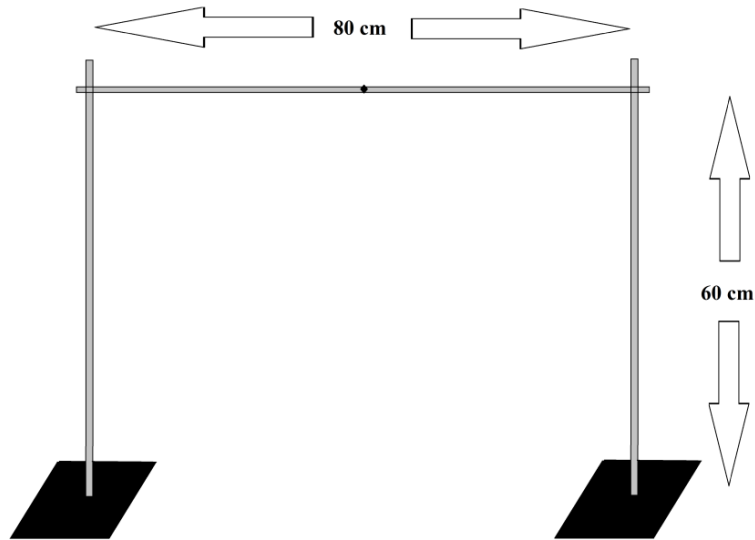
Horizontal hareket, deneğin yer değiştirme ve dikilme yapmaksızın olduğu yerde yaptığı hareketlerdir. Vertikal hareket, dikilme hareketidir ve bantlar üzerindeki vertikal sensörler yardımı ile algılanır. Ambulator hareket ise deneğin kafes içinde dikilme

haricinde yaptığı her türlü yer değiştirme (gezinme) hareketidir. Horizontal ve vertikal aktiviteler deney hayvanının stereotipik hareketleri ve agresivitesi hakkında bilgi verici özelliktedir. Her üç aktivite ayrı ayrı değerlendirilebileceği gibi üçünün toplamı total lokomotor aktivite olarak da ifade edilebilir. Sıçanların lokomotor aktivitesi farklı bir ortamda değerlendirildiğinden test öncesi beş dakika aktivite kafesine konarak ortama alışmaları ve yeni bir ortamı keşfe yönelik aktivitedeki artışların en aza indirilmesi sağlandı. Sıçanlar iyi aydınlatılmış ve sessiz bir ortamda lokomotor aktivite kafesine alınarak 10 dakika boyunca hareketleri kaydedildi. Her bir denek arasında kafes %70 alkol ve su ile silindi.

5.1.3 Kuyruktan Asma Testi

Bu testin esası denek kuyruğundan asıldığı yerden kurtulmak için çırpınmak zorundadır. Belli bir süre içinde olduğu durumdan kurtulmaya çabalar. Bir süre sonra artık içinde bulunduğu ortamdan kurtulma ile ilgili derin bir ümitsizlik gelişir ve sıçan çırpınma gayretini bırakarak hareketsiz bir şekilde (immobilizasyon) asılı kalır. Bu hareketsiz kalma anı “umutsuzluk” durumu olarak isimlendirilir. Sıçanın “umutsuzluğa” giriş (hareketsiz kalıncaya kadar geçen süre) ve hareketsiz kalış süreleri ölçülür (72, 73).

Her bir sıçan kuyruğundan 20 cm uzunluğundaki elektrik bantı ile hazırlanan düzeneğe (yüksekliği 60 cm, metal çubuk) asıldı ve 6 dak süre ile yaptığı çırpınma hareketleri kaydedildi.

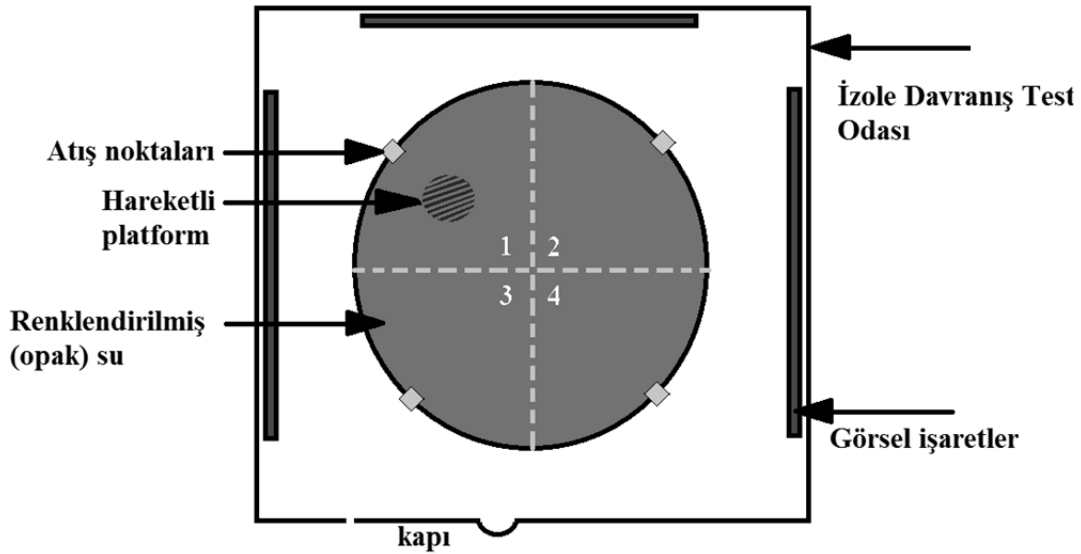


Şekil 10. Kuyruktan asma testi için hazırlanan düzenek

5.1.4 Morris Su Labirenti Testi

Morris su labirenti testi, renklendirilmiş su ile dolu, dairesel, genişçe bir su tankı ve bu tank içerisine yerleştirilmiş bir platformdan oluşan düzenek kullanılarak yapıldı. Sıçan su tankına yerleştirildiğinde en kısa sürede ve en kısa yoldan platforma ulaşmaya çalışması test edildi. Deney hayvanının izlediği yol ve harcadığı zaman kameralı bir sistem ile (Ethovision, Noldus) tespit edildi. Tekrarlayan denemeler sonunda sıçan, gizlenmiş platformu daha kısa sürede ve/veya daha az yol kat ederek bulmaya başlar. Bu test mekansal öğrenme ve belleğin değerlendirilmesinde ve nörobilişsel bozuklukların araştırmasında kullanılmaktadır.

Kullanılan su tankı dairesel olup 120 cm çapında galvanizli ve 50 cm yüksekliğine sahiptir. Tank 25 cm kadar su ile dolduruldu ve gıda boyası ile boyandı ve 10 cm çapındaki platformun su yüzeyinden 1 cm alta bırakılarak sıçanlar tarafından görünmesi engellendi. Suyun sıcaklığı 24 ± 2 °C’de sabit tutuldu. Su tankın yerleştirildiği konum ve platform yeri deney süresince sabit tutuldu.



Şekil 11. Morris su labirenti testi düzeneği. (Paul’dan değiştirilerek alınmıştır 54)

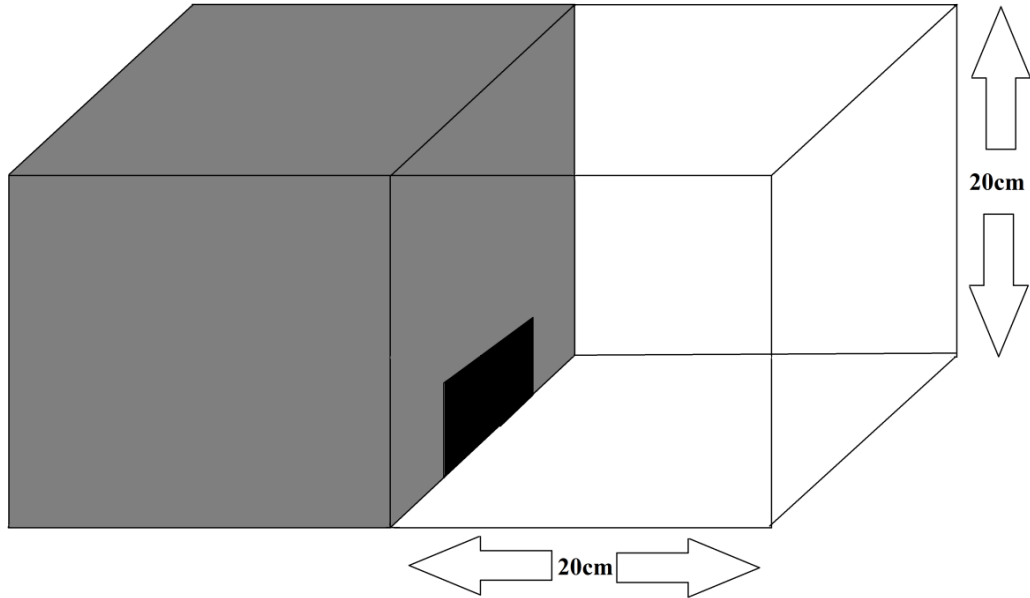
Deneklerin bulunduğu yerin uzaysal konumunu algılayabilmeleri için görsel bir işaret tank dışına konuldu. Sanal olarak dört eşit parçaya ayrılan tankın bir çeyreğinin ortasına tank duvarından 30 cm uzaklıkta kalacak şekilde platform bırakıldı. Sıçanlar sırayla diğer $\frac{1}{4}$ oranındaki alanlardan birine bırakıldığında yüzerek platformu bulmaları için 60 saniye (sn) zaman verildi. Platformu bulunca 30 sn platform üzerinde dinlenmelerine izin verildi. Sonra sıçanlar alınıp kurutularak ayrı bir kafeste 30 sn

bekletildi. Farklı bir çeyrekten tekrar su tankına bırakılarak aynı işlem her hayvan için 4 kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri kaydedildi. 60 sn içinde platformu bulamayan sıçan alınıp platforma bırakıldı ve 30 sn platform üzerinde kalması sağlandı. Her hayvan için 5 gün süreyle aynı denemeler yapıp deneklerin öğrenme yeteneği zaman olarak (sn) kaydedildi.

Belleğin pekiştirilme işlemini test etmek için 5 günlük testten 24 saat sonra platform kaldırılarak test uygulandı. Denekler doğal olarak platformun önceden bulundukları tankın dörtte birlik kısmında daha çok arama yaparlar. Bu süre belleğin pekiştirilmesini ölçer. Deneklerin eski platformun bulunduğu dörtte birlik alanda yüzdükleri süre kaydedildi.

5.1.5 Karanlık-Aydınlık Alan Testi

Bu modelde sıçanın anksiyete durumunu ölçmek üzere, biri karanlık diğeri aydınlatılmış bölümleri olan iki bölümlü pleksiglas düzenek kullanıldı. Sıçanlar düzeneğe karanlık tarafından yerleştirilerek 5 dakika boyunca hareketleri kamera ile kaydedildi (71, 72). Karanlık ve aydınlık bölümler arasındaki geçiş sayısı ve aydınlık bölümde harcadığı zaman hayvanın karanlık bölüm ile ilgili tercihi hakkında bilgi verir.

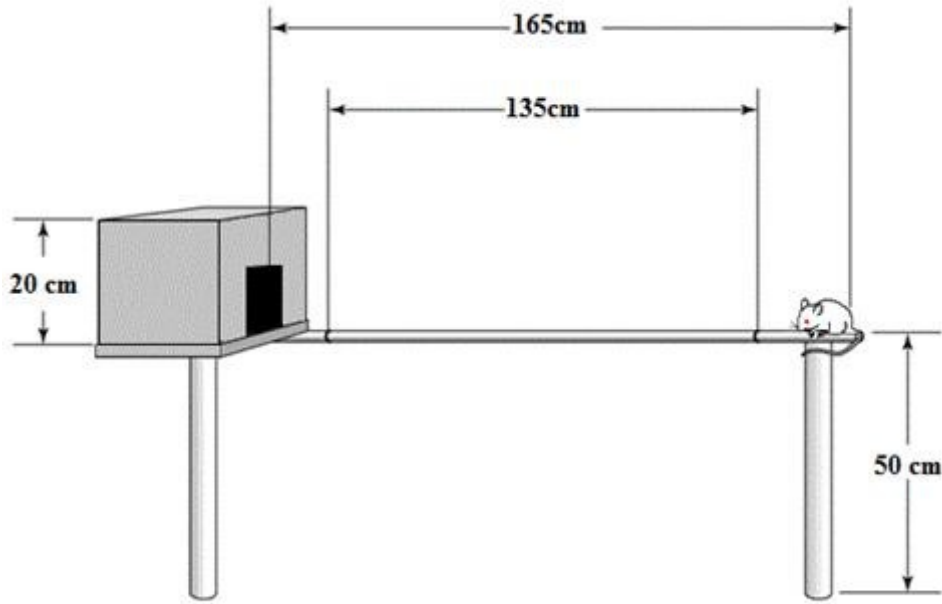


Şekil 12. Karanlık-aydınlık alan testi için hazırlanan pleksiglas düzenek.

5.1.6 Beam Denge Testi

Nörolojik bir kusuru devre dışı bırakmak için bu test uygulandı. Başlangıç noktasına yerleştirilen sıçan gittikçe daralan çubukta yürütüldü. Ne kadar sürede bitişe

ulaştığı ve yürürken kaç defa ayaklarının kaydığı belirlendi. Her sıçan için bu yürüyüş 3 kez tekrar edildi.



Şekil 13. Beam Denge testinde kullanılan düzenek

5.2 İntraserebroventriküler Uygulama

5.2.1 Ozmotik Pompaların Hazırlanması

Deneylerde dört (4) hafta süreyle 0.25µl/ saat icv infüzyon yapma özelliğine sahip ozmotik pompalar (Alzet 2004,ABD) kullanıldı. Ozmotik pompalara infüzyon kitine bağlanacak olan metal kakülü kapak parçasına yerleştirildi, pompa seti içerisinde birlikte gelen ucu küt özel bir iğne kullanılarak kontrol ve letrozol grubu için yapay serum fizyolojik ve deney grupları için 10 nmol kisspeptin ile dolduruldu.

5.2.2 Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması

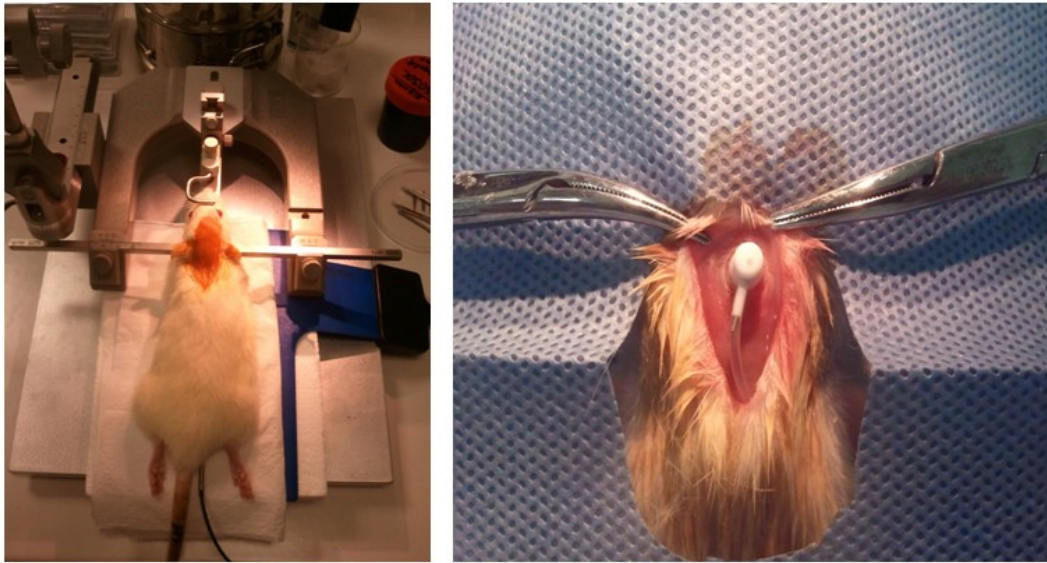
Bu çalışmada sıçan lateral ventrikülüne enjeksiyon için tasarlanmış beyin infüzyon kitleri (Alzet, ABD) kullanıldı. Metal kanülün derinliği kit ile birlikte gelen 0.5 mm pullar kullanılarak lateral ventrikül için 4.5 mm olacak şekilde ayarlandı. Kanüller beyin infüzyon kitine takıldı ve içerisi infüze edilecek maddelerle (kontrol ve letrozol grubu için yapay serum fizyolojik ve deney grupları için ise 10 nmol Kisspeptin) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu. İçerisi SF veya Kisspeptin ile doldurulmuş beyin infüzyon kiti kanül ve pompaya bağlandı ve sıçana yerleştirilene kadar steril petri içinde aseptik koşullar altında tutuldu.

5.2.4 Hayvanların Hazırlanması

Sıçanlar intramusküler olarak 75 mg/kg ketalar (Pfizer), 5 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer) ile anesteziye alındılar. Sıçanların parmak kısırtma yanıtları ve göz refleksleri izlenerek anesteziye girdikleri saptandı ve spontane hareketleri kaybolan sıçanların kafa derilerine batikon sürüldü, gözlerine de steril göz pomadı sürülerek operasyona hazır hale getirildi.

5.2.5 Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi

Sıçanlar stereotaksik cihaza önce ağız kısmı sonra da kulaklarından kafasının yüzeyi yere tam paralel olacak şekilde sabitlendiler (Rodent Stereotaxic Instruments, David Kopf Instruments). Operasyon boyunca sıçanların vücut ısısının düzenlemek üzere ısıtıcı tabla kullanıldı. Kafatası derisi bisturi ile kesilerek kemik yapıya ulaşıldı. Kemik yüzeyi bisturi ile temizlendi ve bregma açıkça görünür hale getirildi.



Resim 4. Sıçanların stereotaksik ekipmana yerleştirilmesi ve pompanın takılması

Bregma referans alınarak önceden belirlenen koordinatlar doğrultusunda (lateral, posterior) kafatasında delinecek yer belirlendi. İşaretlenen noktadan tur aleti (matkap) ile duraya zarar verilmeden delik açıldı. Lateral ventriküle girecek olan metal kanül, beyin infüzyon kiti üzerindeki plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihazın tutacağına yerleştirildi ve açılan delikten lateral ventriküle indirildi. Beyin infüzyon kitine bağlı olan pompa, ense derisinin altına yerleştirildi. İnsizyon bölgesi 3.0 ipek iplik ile dikildi ve bu bölgeye % 10 povidon iyodin sürüldü. Hayvanlar uyanana kadar bireysel

kafeslerde tutuldu. Operasyon sonrası her gün hayvanlar kontrol edildi ve iyileşene kadar dikişlerinin pansumanı yapıldı.

5.3 Dokuların Elde Edilmesi

Öğrenme testleri tamamlandıktan sonra sıçanlar dekapite edildi. Sıçanların beyinleri hızla çıkarıldı ve kuru buz içine yerleştirilerek donduruldu. Tüm beyin dokuları analizler yapılana kadar -80 °C’de saklandı. Beyin dokusunun sağ hemisferi Western blot yöntemi kullanılarak PSD-95 ve SYP analizi için, sol hemisfer ise Cresyl violet boyaması için kullanıldı.

Tüm hayvanların vücut ağırlıkları deneylere başlamadan önce ve çalışmanın sonunda belirlendi. Ayrıca, sıçanların uterus ağırlıkları da deneylerden sonra tartıldı.

5.4 Western Blot Yöntemiyle Sinaptofizin ve PSD-95 Analizi

5.4.1 Protein İzolasyonu

Kuru buzda dondurulmuş dokular tartıldı ve steril bir bisturi ile küçük parçalara ayrıldı. Doku çok ince dilimlendi ve proteaz ve fosfataz inhibitor içeren homojenizasyon solüsyonunda (RIPA tamponu) çözündürüldü. Dokunun gramı başına 2.5 ml RIPA tamponu kullanıldı ve homojenizatör (Pellet pestle, Sigma) yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenizatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 20 dakika süreyle 11000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatantlar tüplere alınarak SDS-PAGE ve western blot analizleri için -80 °C’de muhafaza edildi.

5.4.2 Protein Miktarlarının Fluorometrik Tayini

Üretici firmanın standart prosedürüne uygun olarak hazırlanan çalışma solüsyonu (Quant-iT™ Protein kit, Invitrogen) ile 1:200 (v/v) sulandırılan proteinler ve standartlar 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve izole edilen proteinlerin miktarı standartlar ile cihaz kalibrasyonu yapıldıktan sonra Qubit (Invitrogen) florometrik ölçüm yöntemi kullanılarak ölçüldü. Ekranda görülen mililitredeki miktar değeri kaydedildi.

5.4.3 Protein Örneklerinin Hazırlanması

Qubit fluorometer cihazı ile yapılan ölçüm sonrası elde edilen protein miktar değerine ve transfer sonrası kullanılacak deteksiyon (Kemiluminesans) yöntemine göre jele yüklenecek protein miktarı 30 µg olarak belirlendi ve örnekler tablo 3.’deki gibi hazırlandı:

Tablo 3. Örneklerin hazırlanması

REAKTİF	MİKTAR
Örnek	5.5 µl
NuPAGE LDS Örnek tamponu (4X)	2.5 µl
NuPAGE Redükleyici Ajan (10X)	1.0 µl
Deiyonize su	1.0 µl
TOPLAM	10µl

Hazırlanan örnek 70 °C’de 10 dakika boyunca denatüre edildi. İşlem sonrasında buz üzerine alınarak soğutuldu.

5.4.4 Örneklerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE

Kaynatılan proteinler SDS-PAGE için % 4-12 NuPAGE Novex Bis-Tris mini jel (Invitrogen) ve MES SDS yürütme tamponu kullanıldı. Örnekler kuyulara yüklendi. Yüklenen örnekler 35 dakika 200 V’da yürütüldü.

5.4.5 Western Blot Analizi

Western blotlama işlemi iBLOT dry blotting sistemi (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirildi. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel, PVDF membran içeren transfer plakalarına (Invitrogen) arada boşluk kalmayacak biçimde yerleştirildi ve bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu. Spesifik olmayan bağlanmalar, TBST içinde hazırlanmış % 2’lik yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 60 dakikalık inkübasyonla blokladı. PVDF membranlar, primer antikorlar ile +4 °C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra PVDF membranlar, HRP bağlı sekonder antikor ile oda sıcaklığında 120 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. PVDF membranlar, 5 dakika ECL solüsyonu ile oda sıcaklığında inkübe edildi ve membran üzerindeki bantlar kemilüminesans görüntüleme cihazı (DNR, MF-ChemiBis 3.2) ile fotoğraflandı ve bantların rölatif yoğunlukları analiz edildi.

5.5 Cresyl Violet Boyaması ile Nöron Sayılarının Belirlenmesi

5.5.1 Örneklerin Hazırlanması

Sıçanların -80 °C’ de saklanan beyin sol hemisfer dokuları Cryostat (Leica) kullanılarak 15µ kalınlıkta kesilerek hipokampus, korteks ve hipotalamus bölgelerini içeren kesitler elde edildi. Kesitler analiz için kullanılıncaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

5.5.2 Cresyl Violet Boyaması

Kesitler % 4 PFA ile oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi. İşlem sonunda karıştırıcı üzerinde 5 dakika distile su ile yıkandı. Kesitler Cresyl Violet (0.5 g/ml, Sigma) solüsyonuna yerleştirilerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Distile su ile 1 kez 2 dakika yıkama yapıldı. Kesitler alkol serisinden (% 70, % 90, % 95, % 100) geçirilerek, dokudaki su uzaklaştırıldı. Son olarak ksilen konuldu ve Clarion Mounting (Sigma) solüsyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı. Değerlendirme için mikroskopta (Nikon 80i) görüntülendi ve hücre sayımı yapıldı.

5.6 Serum Hormon Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

5.6.1 Serum Elde Edilmesi

Sıçanlardan operasyon sonrası dekapitasyon sonrası elde edilen kan örnekleri kuru tüplere toplandı ve daha sonra +4 °C’de 10 dakika süreyle santrifüj (3000 devir/dak) edildi. Elde edilen serum örnekleri kuru buz içine yerleştirilmiş 1.5 ml’lik tüplere transfer edilerek hemen donduruldu ve analiz edilinceye kadar -80 °C’de saklandı.

5.6.2 Serum 17 β -E2 Konsantrasyonunun Ölçülmesi

Serum örnekleri hazır olarak alınan 96 numunelik Eliza kitleri (DiaMetra, Foligno, İtalya) kullanılarak ölçüldü. Öncelikle her bir standart ve örnekten ikişerli olacak şekilde 25 μ l kuyucuklara kondu, üzerlerine 100 μ l konjugat solüsyonu da eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Sonra tüm kuyucuklar 300 μ l distile su ile yıkandı ve su kalmayacak şekilde akıtıldı. Tüm kuyucuklara 100 μ l TMB-substrat eklendi ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 100 μ l stop solüsyon eklendi ve 450 nm’de okutuldu. Standart ve örneklerin ortalama absorbans değerleri alındı. Aşağıdaki formül kullanılarak %B/B0 değerleri bulundu. Standart eğri logit-log grafik ile çıkartılarak örneklerin %B/B0 değerleri yerleştirilerek 17 β -E2 konsantrasyonları pg/ml cinsinden hesaplandı.

5.7 Sıçanlarda Vajinal *Smear* Değerlendirilmesi

Puara sabitlenmiş pipete 0.5 ml serum fizyolojik çekildi. Sıçana karnı üstte başı aşağı meyilli olacak şekilde pozisyon verilerek serum fizyolojik çekilmiş pipetin ucu vajinaya yerleştirilerek puar iki üç kez yavaşça sıkılarak vajinal sekresyon ve hücrelerin pipete alınması sağlandı. Pipetteki sıvıdan bir damla lam üzerine damlatılıp boyanmadan ışık mikroskobunda 10x ve 40x büyütmede incelendi. Mikroskopik incelemede sıçanların reproduktif sikluslarının hangi safhada oldukları tespit edildi.

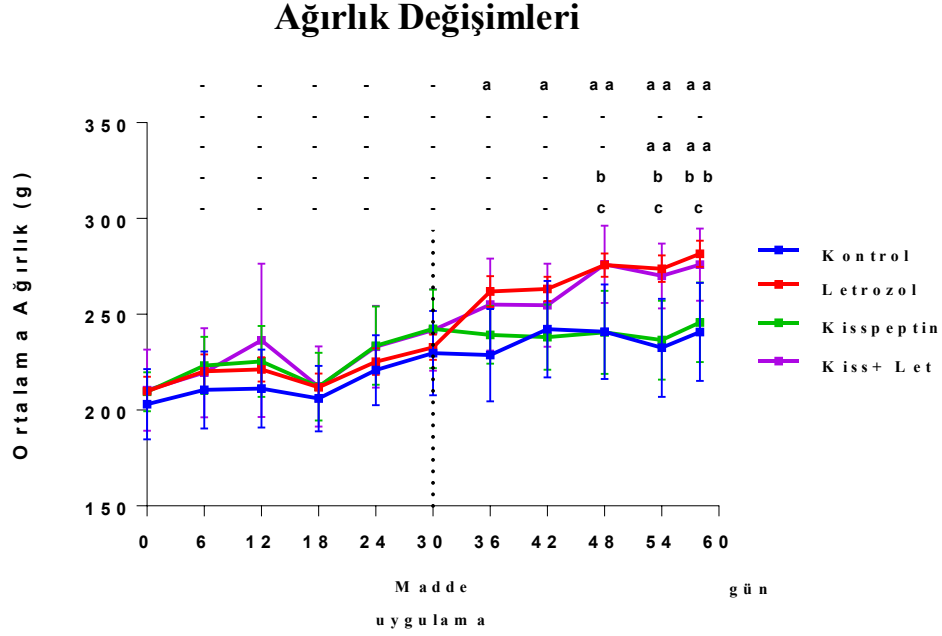
Diöstrus (bazal ve parabazal hücreler), proöstrus (çok sayıda intermedier, az sayıda parabazal ve süperfisial hücreler), östrus (karnifiye süperfisial hücre, keratinize hücre) safhaları her sıçan için ayrı ayrı kaydedildi. Üst üste iki kez normal reproduktif siklus özelliği gösteren sıçanlar (ortalama 12-15 gün) deney grubuna dahil edildi.

5.8 İstatistiksel Analiz

Veriler bilgisayarda SPSS 20.0 (Statistical Packages of Social Sciences) programı kullanılarak analiz edildi. Sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma açıklayıcı istatistikler olarak kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Gruplar arası varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. İki'den fazla grubun normal dağılıma uyan varyansları homojen değişkenlerin karşılaştırmasında ANOVA, grupların ikili karşılaştırması için ise LSD testi yapıldı. Varyansları homojen bulunmayan değişkenlerin grup karşılaştırmasında ise Welch testi, ikili karşılaştırmaları için ise Mann-whitney U testi yapıldı. $P < 0.05$ olması durumunda aradaki fark anlamlı kabul edildi.

6 BULGULAR

6.1 Ağırlık Ölçümleri

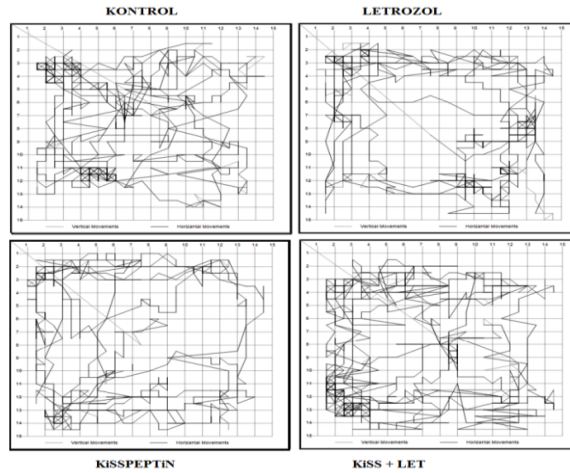


Şekil 15. Sıçanların ölçülen ortalama ağırlıkları (ORT $\pm$ SD, a; $p < 0.05$, aa; $p < 0.01$ kontrol ile diğer grupların sırasıyla karşılaştırılması, b; $p < 0.05$, bb; $p < 0.01$ letrozol ile kisspeptinin karşılaştırılması, c; $p < 0.05$, cc; $p < 0.01$ kisspeptin ile kisspeptin + letrozol karşılaştırılması için kullanılmıştır.)

Çalışmanın başından itibaren takip edilen deney hayvanlarının vücut ağırlıkları ortalamaları karşılaştırıldığında madde uygulamaları öncesi anlamlı bir fark belirlenemedi. Ancak letrozol ve kisspeptin+ letrozol uygulamaları, kontrol grubu ve kisspeptin ile karşılaştırıldığında ortalama ağırlıklar anlamlı olarak artmıştır.

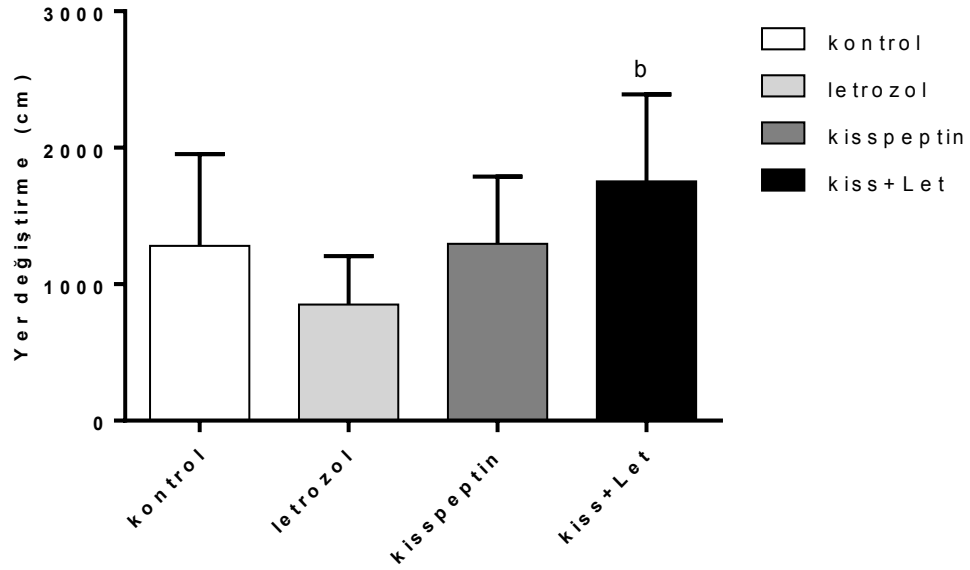
6.2 Davranış Testleri

6.2.1 Lokomotor Aktivite Testi Bulguları



Şekil 16. Lokomotor aktivite testi yer değiştirme haritaları

Alınan Yol

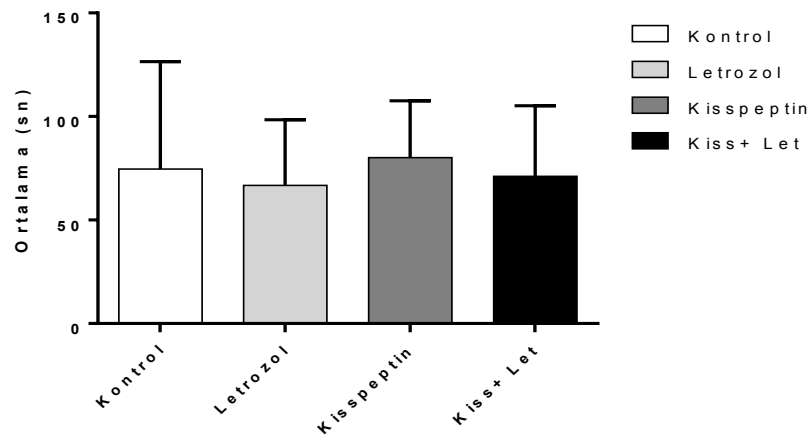


şekil 17. Lokomotor aktivite testi alınan yol grafiği. (ORT ± SD, b; $p < 0.05$ letrozol ile kiss+let karşılaştırması)

Lokomotor aktivitesi testi sonrası elde edilen bulgulara göre letrozol ve kisspeptin+ letrozol uygulanan gruplar karşılaştırıldığında 10 dakikada alınan yol mesafesinde anlamlı bir artış görülmüştür.

6.2.2 Kuyruktan Asma Testi Bulguları

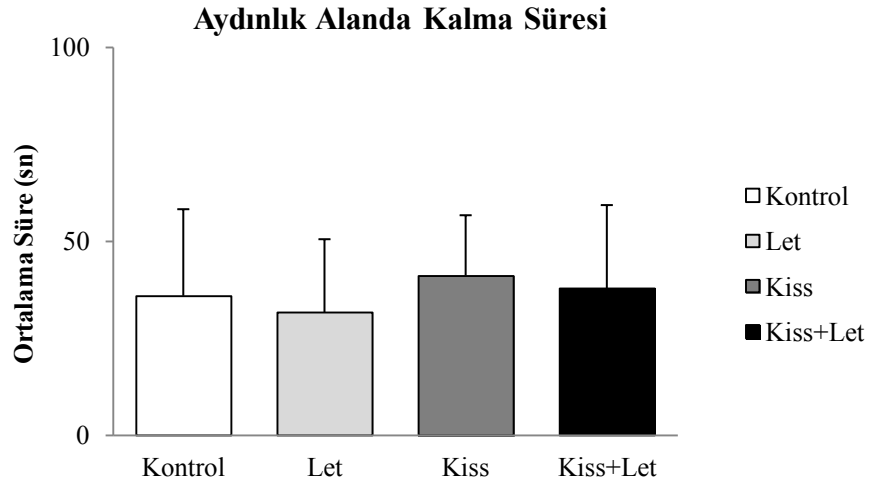
Hareketsiz Kalma Süreleri



şekil 18. Kuyruktan asma testi sonuçları (ORT ± SD, $p < 0.05$).

Hareketsiz kalma sürelerine göre karşılaştırma yapıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

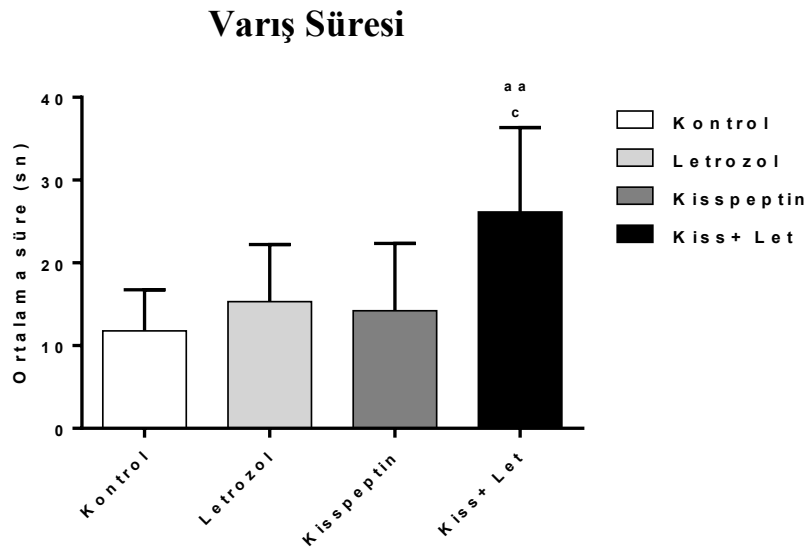
6.2.3 Karanlık-Aydınlık Alan Testi Bulguları



Şekil 19. Karanlık/Aydınlık Alan test sonuçları (ORT $\pm$ SD, $P < 0,05$)

Aydınlık alanda geçirdiği süreler karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

6.2.4 Beam Denge Testi Bulguları

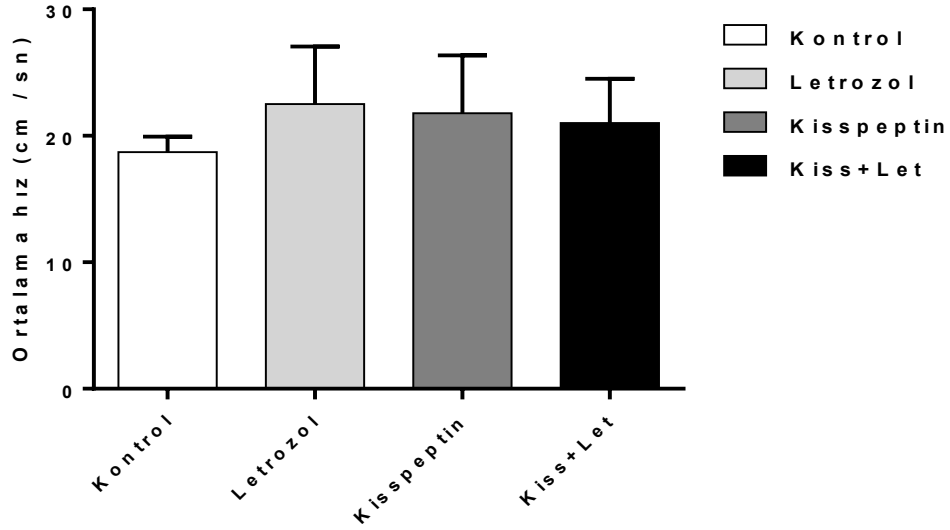


Şekil 17. Beam denge testi sonuçları (ORT $\pm$ SD; aa: $P < 0.01$ kontrol grubuyla, c: $P < 0.05$ kisspeptin grubu ile karşılaştırmayı göstermektedir.)

Kontrol ve kisspeptin gruplarıyla karşılaştırıldığında kisspeptin+ letrozol grubunun çubuğu geçme süresi anlamlı olarak uzundu.

6.2.5 Morris Su Labirenti Testi Bulguları

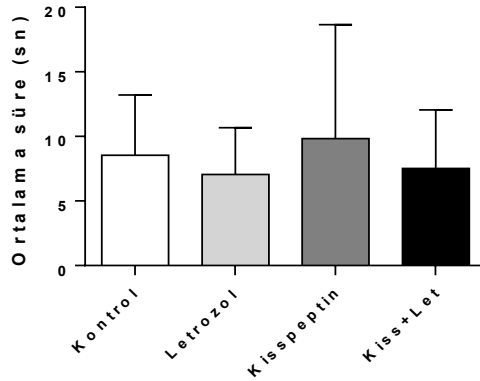
Prob Hızı



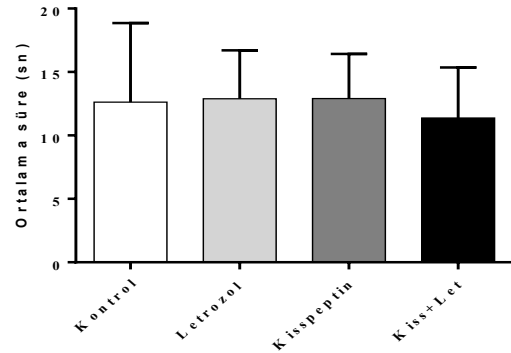
Şekil 21. Prob test sırasında ortalama hareket hızı. (ORT $\pm$ SD; $P < 0.05$)

Prob test esnasında sıçanların ortalama yüzüş hızları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

A40 Süresi



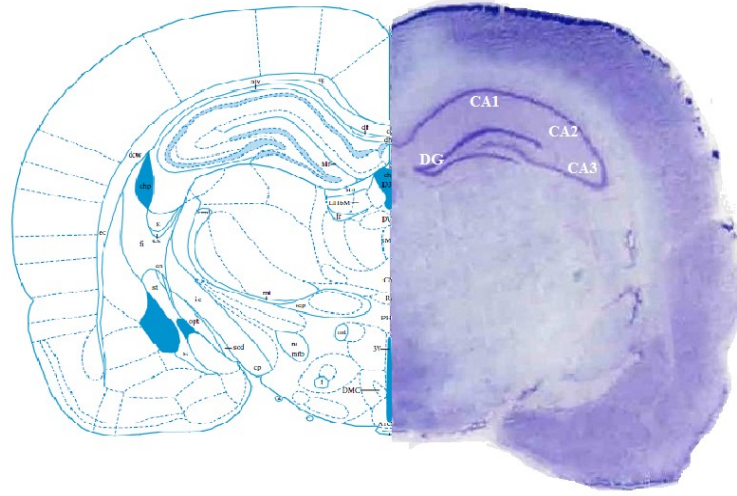
PQ Süresi



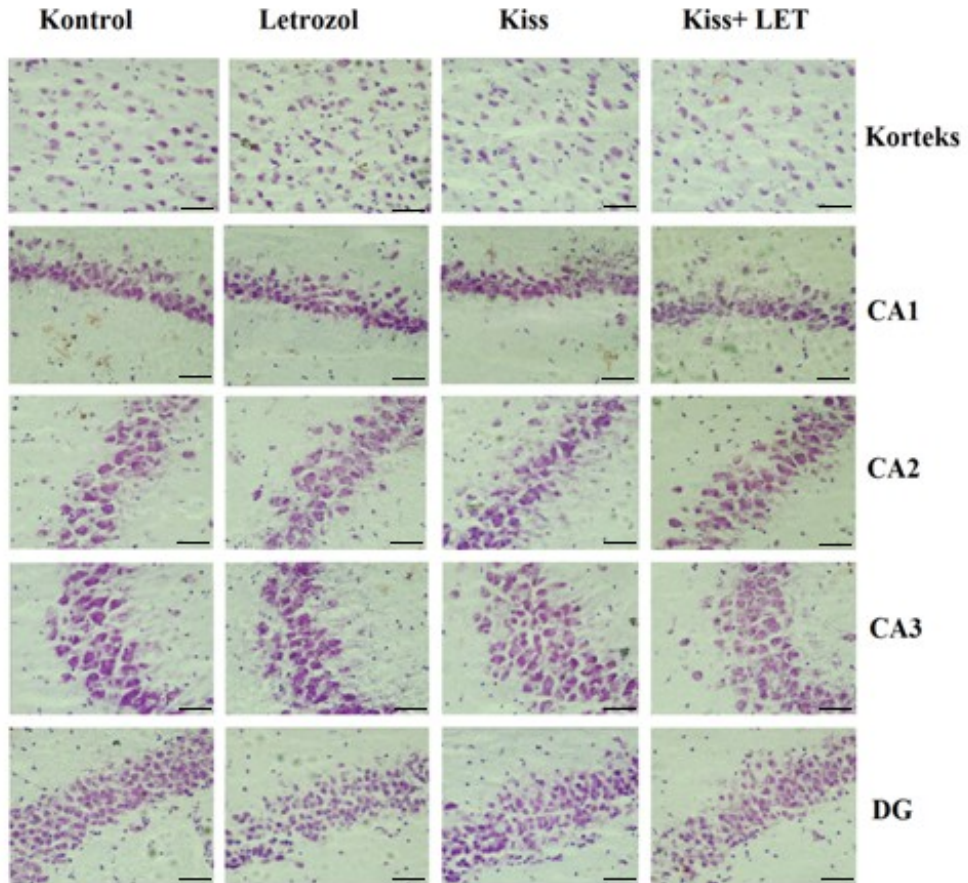
Şekil 22. A40 alanında geçirilen ortalama süreler ve platformun olduğu çeyrekte geçirilen ortalama süre değerleri (ORT $\pm$ SD; $P < 0.05$)

Platformun bulunduğu çeyrekte bulunma süreleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Ayrıca A40 olarak isimlendirilen ve platformun etrafına 40 cm çapında çizilen hayali çember alan içerisinde geçirilen sürelerde de anlamlı bir fark gözlenmedi.

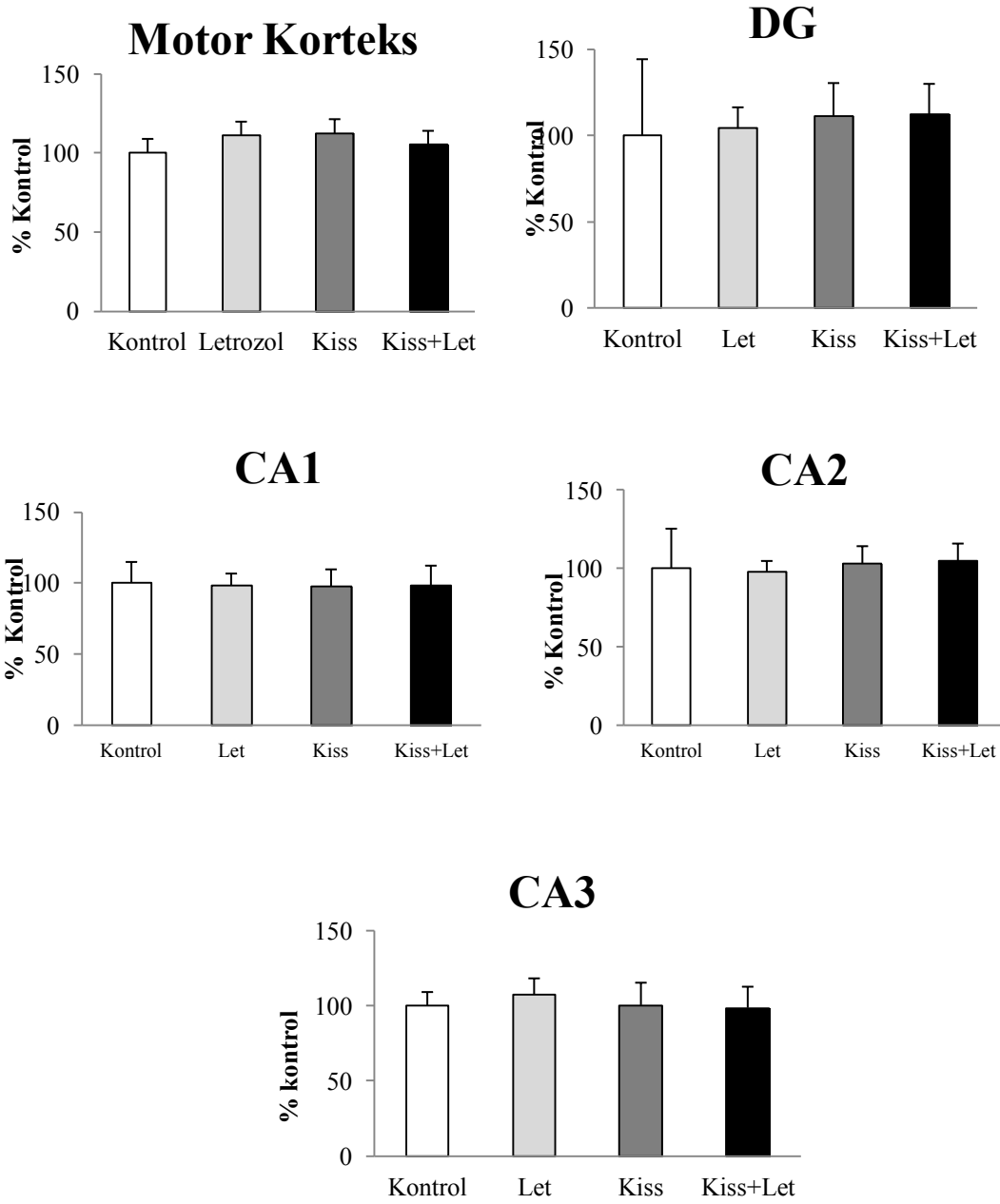
6.3 Cresyl Violet Boyaması Bulguları



Şekil 23. Koronal beyin dokusu Cresyl violet boyaması ve hipokampus temsili görüntüsü. (Beynin diğer yarısı Paxinos'dan alınmıştır.)



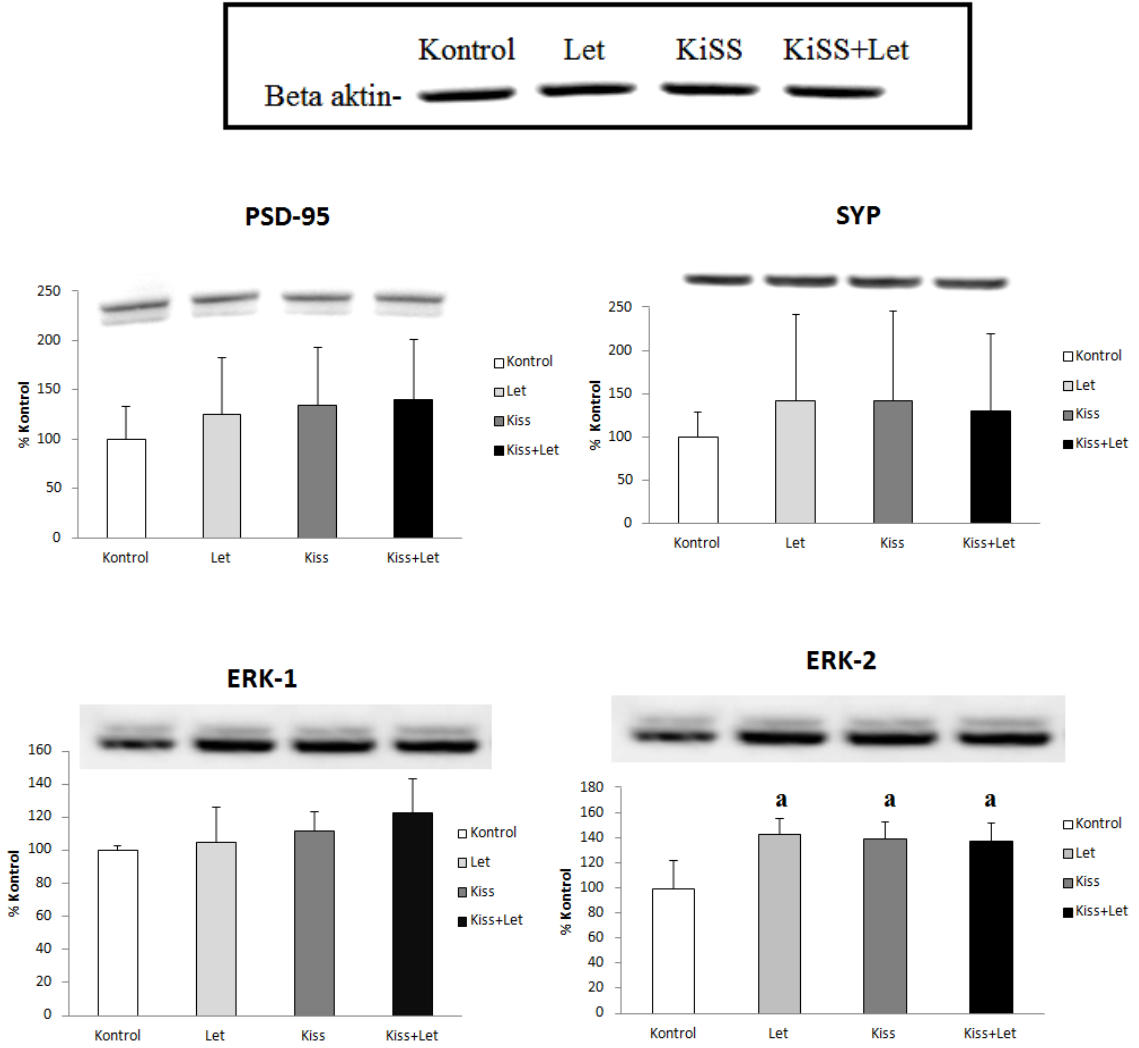
Resim 5. Cresyl Violet boyaması sonrasında sayılan beyin bölgelerinin gösterimi. Bar 50µ (400 X Büyütme)



Şekil 184. Cresyl violet boyaması sonuçları. Korteks ve hipokampusta pozitif boyanan hücre sayılarının % kontrol grafikleri. (ORT $\pm$ SD; $P < 0.05$)

Cresyl violet ile beynin sol hemisferinden alınan koronal kesitler boyandı ve hipokampus (DG, CA1, CA2, CA3), korteks bölgelerindeki boyanan hücreler sayıldı. Bu analize göre uygulamalar sonrasında incelenen bölgelerde gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

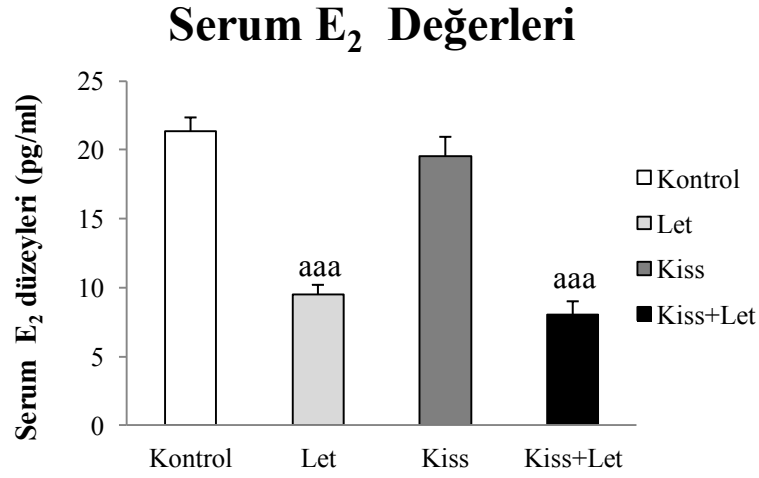
6.4 Western Blot Bulguları



Şekil 25. Western blot sonuçları. Letrozol ve/veya Kisspeptin uygulamalarının ardından beyindeki SYP, PSD-95, pERK-1 ve pERK-2 protein miktarındaki değişiklikler ve yükleme kontrolü olarak beta aktin gösterilmiştir. (ORT ± SD, a; $p < 0.05$ kontrol'e göre karşılaştırılmıştır)

Sağ hemisferden alınan hipokampuslerden izole edilen proteinler karşılaştırıldığında SYP ve PSD-95 protein miktarlarında anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Ayrıca kontrole göre kıyaslama yapıldığında diğer 3 grupta fosforile olmuş ERK miktarı artmıştır.

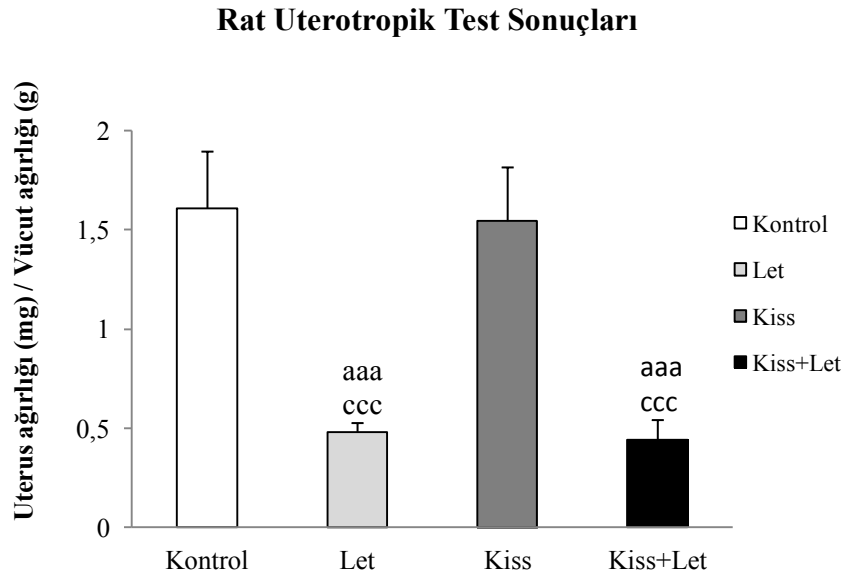
6.5 Serum Östrojen Düzeyleri ELISA Bulguları



Şekil 196. Serum 17 β -E₂ konsantrasyonu (pg/ml, ORT $\pm$ SD, aaa; p<0.001 kontrol ile karşılaştırılmıştır)

Kontrole göre letrozol ve kisspeptin + letrozol uygulamaları, serumdaki 17 β -E₂ konsantrasyonunu anlamlı olarak düşürmektedir.

6.6 Sıçan Uterotropik Test Bulguları



Şekil 207. Uterotropik Test sonuçları. (ORT $\pm$ SD aaa; p< 0.001 kontrole göre, ccc; p< 0.001 kisspeptine göre karşılaştırılmıştır.)

Letrozol ve kisspeptin + letrozol uygulanan gruplarda uterus ağırlığı(mg)/ vücut ağırlığı (g) oranı kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır.

7 TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan bu tezde birkaç soruya cevap arandı. Bunlardan ilki “kronik olarak kisspeptin (10 nmol/gün) uygulanan erişkin dişi sıçanlarda tedavi sonrasında özellikle öğrenme/hafıza, lokomotor aktivite, depresyon, anksiyete gibi davranışlarda değişikliğe neden oluyor mu?” ikincisi ise “östrojenin bu değişiklik üzerine düzenleyici etkisi bulunuyor mu?”

Lokomotor aktivite ölçümleri özellikle rodentlerde sık kullanılan ve hayvanın spontane aktivitesindeki değişiklikleri saptayarak deneklerin anksiyetesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir (70). Literatüre bakıldığında kisspeptin tedavisinin lokomotor aktiveye olan etkisi araştırılmadığı görülmektedir. Deneylerde otomatik aktivite kaydının yapıldığı platformda her hayvan, şeffaf plastik kafesler içerisinde teker teker teste tabi tutulmuştur. Her bir sıçan on dakikalık periyotlarda, operasyondan önce ve sonra olmak üzere iki farklı zamanda izlenmiştir. Operasyon öncesi ve sonrası yapılmasının sebebi bireysel lokomotor aktivite farklılıklarının belirlenmesidir. Locomotor aktivitesi testi sonrası elde edilen bulgulara göre letrozol ve kisspeptin+ letrozol uygulanan gruplar karşılaştırıldığında 10 dakikada alınan yol mesafesini anlamlı olarak arttırmıştır. Her iki gruba da letrozol uygulandığı için siklusları diöstrus olarak aynı döneme gelmiştir, bu nedenle kisspeptin bu doz için lokomotor aktivite üzerine etkisini östrojen sentezinin inhibisyonu sonrası gösteriyor olabilir. Kisspeptinin farklı doz ve sürelerde uygulanmasıyla lokomotor aktivite ve anksiyete üzerine etkileri araştırılabilir.

Overektomize edilip letrozol (2.5mg/kg) uygulanan fareler üzerinde yapılan çalışmada açık alan testi uygulanmış ve farelerin arenanın merkezinde ne kadar süre geçirdiği karşılaştırılmıştır (78). Söz konusu çalışmada letrozolün kontrol grubuna göre daha fazla arenanın kenarlarında zaman geçirdiği ve bu nedenle letrozolün hafif artmış anksiyeteye yol açtığı gösterilmiştir (78). Bunlarla beraber açık alan testinde olduğu gibi aktivite kafesinde merkeze yerleştirilen sıçanların özellikle operasyon sonrası dönemde merkezden çok kafesin köşelerinde vakit geçirdiği belirlendi. Bu durum anksiyete benzeri cevaplar olarak düşünülmektedir. Gruplar arasında anlamlı fark olmaması ile birlikte daha sonra yapılan anksiyete testi de bu durum tekrar değerlendirilmektedir. Menopoz geçişleri sırasında gonadal hormon seviyelerinin iniş çıkışları nedeniyle kadınlarda çok çeşitli anksiyete/depresyon hastalıklarına ve kognitif

bozukluklara karşı hassasiyet artışı olmaktadır (79, 80). Lokomotor aktivitenin artması anksiyete artışı ile alakalı olabilmektedir. Bu nedenle anksiyete ve depresyon testleri yapılarak bu davranışların analizleri pekiştirilmeye çalışıldı.

Operasyon öncesinde ve sonrasında uygulanan kuyruktan asma testi rastgele seçilmiş gruplardaki hayvanların kaçamayacakları bir strese maruz kalması ve kaçmak için çabalamaktan vazgeçmesi temeline dayanmaktadır. İki tekrarlayan deneme arasında uygulanan maddelerin hayvanlar üzerindeki depresyon değişimleri gözlenmektedir. Yapılan testte gruplar arasında depresyon yönünden bir fark belirlenmedi. TST uygulanırken kemirgenlerde stres göstergesi olan dışkılama (defekasyon) sayıları da karşılaştırıldığında, altı dakikalık test sırasında yine gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Karanlık/ aydınlık alan testi tedirgin olan kemirgenlerin aydınlatılmış alanda bulunmak istememesi temeline dayanır (71). Bu nedenle bir tarafı aydınlık diğer tarafı karanlık iki kompartıman içeren pleksiglas kafesler kullanılarak yapılan test sonuçları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı istatistiksel bir fark bulunmadı.

Yapılan operasyon ve sonrasında uygulanan tedavilerin koordinasyon ve denge yeteneklerine olan etkilerini değerlendirmek üzere daralan çubuk denge testi yapıldı. 165 cm'lik gittikçe daralan çubuğu geçiş süreleri karşılaştırıldığında kisspeptin+letrozol grubunun kontrole ve kisspeptin gruplarına göre anlamlı bir şekilde artmış olduğu bulundu. Daralan denge çubuğu üzerindeki hareketlerinin koordinasyon yeteneğinin kisspeptin+letrozol grubunda diğerlerine göre daha azalmış ve olası anksiyete artışı ile beraber amaca yönelik hareketlerde dikkatin azalmasına yol açıyor olabilir. Ayrıca çubukta yürürken sağ ve sol ekstremitelerde tökezlemeler kaydedilip karşılaştırıldı ancak anlamlı fark gözlenmedi.

Son davranış testi olarak Morris su labirenti testi uygulandı. Prob testi bittikten 24 saat sonra dekapitasyon ile deneyler sonlandırıldı. Mekânsal hafızayı test etmekte en yaygın olarak kullanılan, MSL testidir. Bu testte tüm grupların ilk gündeki öğrenme yetenekleri arasında anlamlı farklılıklar bulunmazken, beşinci gün sonunda tüm grupların öğrenme performansının giderek arttığı tespit edildi. Gruplarda ilk gün ile son günün platform bulma süreleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Beş gün arka arkaya yapılan günlük dört denemenin ardından platform kaldırıldı. Platformun olduğu bölgede 40 cm çapında hayali dairesel bir alan içerisinde

sıçanın geçirdiği süre Ethovision programı ile kaydedildi. Deneklerin platformun olduğu yere yakın alanda (A40) daha fazla zaman geçirmesi, yerini daha iyi öğrendiği ve hatırladığı anlamına gelmektedir. Her ne kadar sonuçlar karşılaştırıldığında kisspeptin uygulanan grubun ortalama performansı daha iyi olsa da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Letrozol uygulamasının önceki çalışmalar doğrultusunda östrojen seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (74, 75, 48). Bu tez çalışmasında letrozol verilen gruplarda serum östrojen seviyesinin anlamlı olarak azaldığı hem ELISA hem de uterus ağırlıklarının karşılaştırılması ile anlamlı olarak gösterildi. Elde edilen uterotropik test sonuçlarında göre kontrol ve letrozol arasında, kontrol ve kisspeptin+letrozol arasında, letrozol ve kisspeptin arasında anlamlı farklar bulundu. Benzer şekilde ELISA sonuçlarında letrozolün serum östrojen seviyesini baskılaması bekleniyordu ve anlamlı şekilde azallığı gösterilmiştir.

İnsanlarda ve laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda östrojenin vücut ağırlığını düzenlemede önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir (76, 77). Bu nedenle gruplarda ağırlık takibi yapıldı. Operasyon öncesi ağırlık artışı gruplar arasında anlamlı fark olmaksızın belirlendi. Ancak operasyon sonrasında letrozol uygulanan tüm gruplarda kilo artışı anlamlı olarak gösterilmiş ve bu farkın östrojen sentezi inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Cresyl Violet, beyinde Nisl cisimciklerinin boyanması prensibi ile canlı nöron sayılarının belirlenmesinde kullanılır. Çeşitli beyin bölgelerindeki (hipokampus ve korteks) nöron sayıları bu yöntem kullanılarak belirlendi. Boyanan hücre sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi.

PSD-95, NMDA reseptörünün alt biriminin sitozolik kuyruğu ve potasyum kanalları ile karşılıklı etkileşime girerler. NMDA reseptör sinyaliyle bağlantılı olan plastisite için gereklidir. Normalden fazla ya da eksik üretilmesine bağlı olarak hipokampus nöronlarındaki sinapsların inhibitör ve eksitator oranı değişmektedir (81). PSD-95 miktarının artmasıyla LTP artar, hafıza güçlenir. Bu deneyde hipokampusta PSD-95 ifadeleri western blot yöntemiyle belirlendi ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

SYP, uzun süreli ve kısa süreli sinaptik plastisitenin düzenlenmesinden sorumludur (82). Protein sentezindeki değişiklikler western blot ile incelendiğinde istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Kisspeptin/GPR54 sistemi aktive olduğunda hücre içi sinyal yollarından bir tanesi olan fosforile olmuş ERK1/2 seviyesi western blot yöntemi ile belirlendi ve kontrole göre diğer 3 grubun fosforile olmuş ERK-2 protein miktarları anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0.05$). Birincil fonksiyonu transkripsiyonu aktive etmek olsa da ERK proteinleri potasyum kanalları, sinapsin ve NMDA gibi proteinleri fosforile ederek nöronal fonksiyonlar üzerine direkt etkiye sahiptir (33, 34, 35, 36).

Sonuç olarak, kisspeptin / GPR54 sistemi ERK-2 yolağı üzerinden öğrenme ve hafızayı etkileyebilir. Ancak, kisspeptin'in öğrenme ve hafıza üzerindeki etkilerini araştırmak için farklı doz grupları eklenerek ve/veya öğrenme-hafıza yoksunluğu olan/oluşturulan hayvan modellerinin kullanılması yararlı olabilir.

Son olarak tüm testler değerlendirildiğinde letrozol ile oluşturulan aromataz inhibisyonu, hormonal değişiklikler nedeniyle anksiyete ve öğrenme-hafıza üzerine etkili olabilir. Letrozol, kisspeptinle beraber uygulandığında lokomotor aktivite ve anksiyeteyi arttırabildiği gösterildi.

Literatürde kisspeptinin öğrenme ve hafıza üzerine etkilerinin araştırıldığı *in vivo* bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışması bu konuda yapılan ilk araştırma özelliği taşımaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmada nörogenezi tamamlanmış, kognitif fonksiyonlarının optimal düzeyde olduğu düşünülen sıçanlar kullanıldı. Bu nedenle, uygulanan kisspeptinin öğrenme ve hafıza üzerindeki etkileri çok belirgin olarak gözlemlenememiş olabilir. İleride yapılacak çalışmalarda öğrenme-hafıza yoksunluğu olan (yaşlı hayvanların kullanılması gibi) veya oluşturulan (skopolamin ile indüklenme gibi) hayvan modellerinin kullanılması, kisspeptinin özellikle öğrenme ve hafıza davranışı üzerine etkilerinin incelenmesi için yararlı olabilir.

8 KAYNAKLAR

1. GeneM, Lee J, Miele ME, Hicks DJ, Karen K, Trent J, Weissman B, Welch DR (1996). KiSS-1 a Novel Human Malignant Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 1731-1737.
2. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276: 34631-6.
3. Muir I, Chamberlain L, Elshourbagy N, Michalovich D, Moore DJ, Calamari Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Stepkowski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276: 28969-75.
4. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman, BE (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 54: 145-8.
5. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 29:48-69.
6. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori a, Kanehashi K (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411: 613-7.
7. Harms JF, Welch DR, Miele ME (2003). KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clin Exp Metastasis* 20:11-8.
8. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard D (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446: 103-7.
9. Teles MG, Silveira LFG, Bianco S, Latronico AC (2009). Human diseases associated with GPR54 mutations. *Prog Mol Biol Transl Sci* 88: 33-56.

10. Teles MG, Bianco S, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC (2008). A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 358: 709-715
11. Seminara SB, Crowley WF (2008). Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction. *J Neuroendocrinol* 20: 727-31.
12. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RRAcierno JS, Shagoury JK, Bo-abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG (2003). The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med* 349: 1614-27.
13. Roa J, Tena-Sempere M (2007). KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol* 153: 132-40.
14. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido B V, Crowley WF (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145: 4073-7.
15. Murphy KG (2005). Kisspeptins: regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*. 17: 519-25.
16. 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: 3686-92.
17. Roa J, Vigo E, Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, Casanueva FF (2006). Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology* 147: 2864-78.
18. Arai AC (2009). The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. *Peptides* 30:16-25.
19. Arai AC, Xia YF, Suzuki E, Kessler M, Civelli O, Nothacker HP (2005). Cancer metastasis-suppressing peptide metastatin upregulates excitatory synaptic transmission in hippocampal dentate granule cells. *J Neurophysiol* 94: 3648-52.
20. Arai AC, Xia YF, Rogers G, Lynch G, Kessler M (2002). Benzamide-type AMPA receptor modulators form two subfamilies with distinct modes of action. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1075-1085.

21. Moser MB, Moser EI (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8: 608-19.
22. Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6609-15.
23. Plant TM (2006). The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *Eur J Endocrinol* 155: S11-6.
24. De Roux N (2006). GnRH receptor and GPR54 inactivation in isolated gonadotropic deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20: 515-28.
25. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RRAcierno JS, Shagoury JK, Bo-abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG (2003). The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med* 349: 1614-27.
26. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido B V, Popa SM, Cunningham MJ (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80: 264-72.
27. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 1761-6.
28. The Physiological Society of New Zealand (2012). [online] Available from: <http://physoc.org.nz/news/physiology-in-focus/kisspeptin-neurons> (Accessed 20 December 2012)
29. Castaño JP, Martínez-Fuentes AJ, Gutiérrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagón MM (2009) Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 30:10-5.
30. Masui T, Doi R, Mori T, Toyoda E, Koizumi M, Kami K (2004). Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 315: 85-92.
31. Stathatos N, Bourdeau I, Espinosa AV, Saji M, Vasko VV, Burman KD (2005). KiSS-1/G protein-coupled receptor 54 metastasis suppressor pathway increases myocyte- enriched calcineurin interacting protein 1 expression and chronically inhibits calcineurin activity. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5432-40.

32. D'Anglemonet de Tassigny X, Colledge WH (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology (Bethesda)* 25: 207–17.
33. Adams JP, Anderson AE, Varge AW, Dineley KT, Cook RG, Pfaffinger PJ (2000). The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* 75: 2277-87
34. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74: 49-139.
35. Matsubara M, Kusubata M, Ishiguro K, Uchida T, Titani K, Taniguchi H (1996). Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem* 271: 108-21.
36. Slack SE, Pezet S, McMahon SB, Thompson SW, Malcangio M (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 20: 1769-78.
37. Simpson ER, Merrill JC, Hollub AJ (1989). Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells. *Endocr Rev* 10: 136-48.
38. Abul-Hajj YJ, Iverson R, Kiang DT (1979). Aromatization of androgens by human breast cancer. *Steroids* 33: 205-22.
39. Bulun SE, Simpson ER (1994). Regulation of aromatase expression in human tissues. *Breast Cancer Res Treat* 30: 19-29.
40. Evans TRJ, Di Salle E, Ornati G (1992). Exemestane (FCE 24304), a new aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 137-43.
41. Cohen MH, Johnson JR, Li N (2002). Approval Summary: Letrozole in the treatment of postmenopausal women with advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 665-669.
42. Zwain IH, Yen SS (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140: 3843-3852.
43. Stoffel-Wagner B (2003). Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 64-78
44. Lephart ED (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev* 22: 1-26.
45. Balthazart J, Ball GF (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci* 21: 243-249.

46. Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 89: 567-578.
47. Rossetti ZL, Carboni S (2005). Noradrenaline and dopamine elevations in the rat prefrontal cortex in spatial working memory. *J Neurosci* 25: 2322-2329.
48. Aydin M, Yilmaz B, Alcin E, Nedzvetsky VS, Sahin Z, Tuzcu M (2008). Effects of letrozole on hippocampal and cortical catecholaminergic neurotransmitter levels, neural cell adhesion molecule expression and spatial learning and memory in female rats. *Neuroscience* 151: 186-94.
49. Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I (2003). Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog Neurobiol* 71: 31-41.
50. Kimble GA. Hilgani and Marquis (1961) *Conditioning and learning*. New York: Appleton-Century-Crofts 570 p.
51. Anderson, J. R. (2000). *Learning and memory: An integrated approach*. New York: John Wiley & Sons.
52. Hebb DO (1968). Concerning imagery. *Psychological Review* 75: 466-477.
53. Miller GA (1956). The magical number seven, plus or minus two: Some limits on our capacity for processing information. *Psychological Review* 63 (2): 81-97.
54. Paul CM, Magda G ve Abel S (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res* 203: 151-64.
55. Nyberg L, Persson J, Habib R, Tulving E, McIntosh AR, Cabeza R and Houle S (2000). Large scale neurocognitive networks underlying episodic memory. *J Cognit Neurosci* 12: 163-173.
56. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35: 625-641.
57. Wheeler MA, Stuss DT and Tulving E (1995). Frontal lobe damage produces episodic memory impairment. *J Int Neuropsychol Soc* 1: 525-536.
58. Wheeler MA, Stuss DT and Tulving E (1997). Toward a theory of episodic memory: The frontal lobes and autonoetic consciousness. *Psychol Bull* 121: 331-354.

59. Hayes SM, Ryan L, Schnyer DM and Nadel L (2004). An fMRI study of episodic memory: Retrieval of object, spatial, and temporal information. *Behav Neurosci* 118: 885-896.
60. Kessels RPC, de Haan EHF, Kappelle LJ and Postma A (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev* 35: 295-303
61. Morris, R.G.M. (1981). Spatial localisation does not depend on the presence of local cues, *Learning Motivation* 12: 239-260.
62. Morris RGM (1983). An attempt to dissociate 'spatial mapping' and 'working-memory' theories of hippocampal function. In W. Siefert (Ed.) *Molecular, Cellular and Behavioural Neurobiology of the Hippocampus*, Academic Press, London; 405-432.
63. Ingram DK (1985). Analysis of age-related impairments in learning and memory in rodent models. *Ann N Y Acad Sci* 444: 312-31.
64. Gallagher M, Pelleymounter MA (1988). Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. *Neurobiol Aging* 5-6: 549-56.
65. Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681-683
66. Teng E and Squire LR (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature* 400: 675-677.
67. O'Keefe J, Nadel L (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford.
68. Squire LR (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82: 171-177.
69. Paxinos G, Watson C: (1998) *The Rat Brain n Stereotaxic Coordinates* 5th Edition, New York: Academic Press.
70. Tayfun Uzbay (2004). Psikofarmakolojinin temelleri ve deneysel araştırma teknikleri. Birinci baskı. Çizgi Tıp Yayınevi, Ankara, 97-104.
71. Crawley JN, Goodwin FK (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 167-170.

72. Fukui M, Rodriguiz RM, Zhou J, Jiang SX, Phillips LE, Caron MG, Wetsel WC (2007). Vmat2 heterozygous mutant mice display a depressive-like phenotype. *J Neurosci* 39: 10520-9.
73. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85: 367-370.
74. Bhatnagar AS, Hausler A, Schieweck K, Lang M, Bowman R (1990). Highly selective inhibition of estrogen biosynthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37: 1021-1027.
75. Schieweck K, Bhatnagar AS, Batzl C, Lang M (1993). Anti-tumor and endocrine effects of non-steroidal aromatase inhibitors on estrogen dependent rat mammary tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 633-636.
76. Wade GN, Gray JM (1979). Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* 22: 583-593.
77. Tchernof A, Calles-Escandon J, Sites CK, Poehlman ET (1998). Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormone-replacement therapy. *Coron Artery Dis* 9: 503-511.
78. Meng FT, Ni RJ, Zhang Z, Zhao J, Liu YJ, Zhou JN (2011). Inhibition of oestrogen biosynthesis induces mild anxiety in C57BL/6J ovariectomized female mice. *Neuroscience bulletin* 27: 241-50.
79. Yaffe K, Lui LY, Grady D, Cauley J, Kramer J, Cummings SR (2000). Cognitive decline in women in relation to non-protein-bound oestradiol concentrations. *Lancet* 356: 708-712.
80. Cohen LS, Soares CN, Vitonis AF, Otto MW, Harlow BL (2006). Risk for new onset of depression during the menopausal transition: the Harvard study of moods and cycles. *Arch Gen Psychiatry* 63: 385-390.
81. Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe M, Makhinson M (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396 (6710): 433-9.
82. Janz R, Südhof TC, Hammer RE, Unni V, Siegelbaum S, Bolshakov VY (1999). Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron*, 24, 687-700.

9 ETİK KURUL ONAYI



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU (YÜDHEK)

ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13.01.2012	240	01.01.2012 tarihli yazı	Doç.Dr.Sinan CANPOLAT

'Dişi sıçanlarda Kisspeptin ve Aromataz İnhibisyonunun kognitif fonksiyonlar ve davranış üzerine etkileri' başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Prof. Dr. Işıl Aksan KURNAZ	
Üye	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. C. Narter YEŞİLDAĞLAR	KATILMADI
Üye	Yrd. Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Hatice ÖZTÜRK	
Üye	Semra TECÜMEN	KATILMADI

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. KİMLİK NO : 38753000220
SOYADI, ADI : EYUBOĞLU DİNÇ SİĞNEM
UYRUĞU : T.C.
DOĞUM TARİHİ ve YERİ : 21/07/1986
MEDENİ HALİ : EVLİ
TELEFON : 0538480-80-55
E-POSTA : eyuboglusignem@gmail.com
YAZIŞMA ADRESİ : İstiklal Mah.Kazımkarabekir Cad. Fener Sok.
Birlik Apt. A Blok No:15 D:14 Ümraniye /İstanbul

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun olduğu kurumun adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	halen
Lisans	Haliç Üniversitesi	2008
Lise	Nevzat Ayaz Y.D.A.Lisesi	2004

AKADEMİK/MESLEK DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl/Yıl)
Fizyoloji Araş. Asistanı	Yeditepe Üniversitesi	2009/-

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR/BİLDİRİLER

- Tug N, Uslu U, Cumbul A, **Eyuboglu S**, Cam C, Karateke A ve Yilmaz B. (2011). Effects of the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetorelix in the early postimplantation period on rat pregnancy. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, 155(2), 166–70.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

- BSN (British Society of Neuroendocrinology) Annual Conference 2011 sözlü poster sunumu ikincilik ödülü. **Eyuboglu S**, Kilic U, Ugur M, Seker B, Can B, Findik S, Yilmaz B and Kilic E. "Effects of melatonin and memantine on brain injury and intracellular signaling: roles of AKT, p38, p21 and ERK1/2 phosphorylation" Cambridge, 3-5 Temmuz 2011.
- Young FEPS 2011 sözlü sunum ikincilik ödülü **Eyuboglu S**, Keleştemur T, Kilic E, Kilic U, Yilmaz B. "Endocrine modulatory effects of BPA and Oestradiol on the brain Kisspeptin/GPR54 system in immature rat uterotrophic assay model." İstanbul, 3-7 Eylül 2011

HOBİLER

Fotoğraf çekmek, halk oyunları,

