T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATERNAL ÇİNKO EKSİKLİĞİ OLUŞTURULMUŞ DİŞİ SIÇANLARDA ÇİNKO EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN PUBERTAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Buse GÜNAYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

KONYA-2022

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MATERNAL ÇİNKO EKSİKLİĞİ OLUŞTURULMUŞ DİŞİ SIÇANLARDA ÇİNKO EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN PUBERTAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Buse GÜNAYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 20202005 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2022

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve akademik hayatım boyunca destekleri ve bilgi birikimiyle bana ışık tutan, deneyimleriyle yardımcı olan, bana inanan ve her zaman arkamda olduğunu hissettiren, öğrencisi olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim, her zaman benim için örnek teşkil eden ve edecek olan, çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI'ya sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen ayrıca tez çalışmamın analiz kısmında yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ'a yine lisansüstü eğitimim boyunca bilgilerini, deneyimlerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Nilsel OKUDAN ve sayın Prof. Dr. Muaz BELVİRANLI'ya, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın uygulama kısmında yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım hocam Karatay Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğretim Üyesi Elif GÜLBAHÇE MUTLU'ya, hem çalışmalarım hem de hayatım boyunca hep yanımda olan ve olacaklarını bildiğim Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Arş. Gör. Dr. Ömer ÜNAL ve Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda görev yapan Arş. Gör. Dr. Nilüfer AKGÜN ÜNAL'a, yine çalışmalarımdaki yardımları için Arş. Gör. Dr. Saltuk Buğra BALTACI'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarım boyunca yardımlarını, desteğini esirgemeyen Dr. Osman ALÇAY'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte uzaktan da olsa desteklerini, sevgilerini her zaman yanı başımda hissettiren, bana güç veren çok sevdiğim canım aileme, Birol GÜNAYDIN, Selma GÜNAYDIN ve Özge GÜNAYDIN'a, ve yine hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Mehmet Sami TÜRKER'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vi**

ÖZET ..... **xi**

SUMMARY ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Çinko 2

1.1.1. Çinko Kaynakları 2

1.1.2. Vücutta Çinko Dağılımı 3

1.1.3. Çinko Taşıyıcıları ve Çinko Emilimi 3

1.1.4. Çinkonun Biyokimsayal Reaksiyonları 7

1.1.5. Çinko Parmak Proteinleri 10

1.1.6. Çinko Eksikliği 13

1.1.7. Maternal Çinkonun Önemi 13

1.2. Ergenlik 14

1.2.1. Ergenliğin Başlangıcı 15

1.2.2. Ergenliğin Fizyolojisi 15

1.2.3. Ergenliğin Metabolik Kontrolü 22

1.3. Ergenlik ve Çinko 29

2. GEREÇ VE YÖNTEM **32**

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar 32

2.2. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri 33

2.3. Çinko Uygulaması 33

2.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması 33

2.5. Hipotalamus Dokusundan RNA İzolasyonu 34

2.5.1. mRNA'lardan cDNA Elde Edilmesi 34

2.5.2. Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi 36

2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi 37

2.6.1. Serum Çinko Analizi 37

2.6.2. Hipotalamus Dokusunda NPY, Kisspeptin, Leptin, GnRH, FSH, LH Analizi 37

2.7. İstatistiksel Analiz 39

3. BULGULAR 40

3.1. Serum Çinko Seviyeleri Bulguları 40

3.2. RT-PCR Bulguları 41

3.2.1. Kisspeptin Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları 41

3.2.2. GATAD1 Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları 41

3.2.3. NPY Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları 42

3.2.4. GnRH Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları 43

3.3. ELISA Bulguları 44

3.3.1. Kisspeptin Bulguları 44

3.3.2. GnRH, FSH, LH Bulguları 45

3.3.3. Leptin Bulguları 48

3.3.4. NPY Bulguları 49

4. TARTIŞMA 51

4.1. Serum Çinko Bulgularının Tartışılması 51

4.2. PCR Testi Bulgularının Tartışılması 51

4.2.1. Kisspeptin Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 51

4.2.2. GATAD1 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 52

4.2.3. NPY Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 52

4.2.4. GnRH Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması 53

4.3. ELISA Testi Bulgularının Tartışılması 54
4.3.1. Serum Kisspeptin Bulgularının Tartışılması 54
4.3.2. Serum GnRH, FSH, LH Bulgularının Tartışılması 55
4.3.3. Serum Leptin Bulgularının Tartışılması 56
4.3.4. Serum NPY Bulgularının Tartışılması 57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 59
6. KAYNAKLAR 60
7. EKLER 74
EK-A: Etik Kurul Onayı 74
EK-B: Turnitin Raporu 75
8. ÖZGEÇMİŞ 77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgRP: Agouti proteinle ilişkili peptit

ARC: Arkuat nükleus

AVPV: Anteroventral periventriküler çekirdek

CART: Kokain-amfetamin düzenleyici transkript

CKO: Koşullu nakavt fareler

CPP: Merkezi erken ergenlik

Cu/Zn-SOD: Bakır/çinko süperoksit dismutaz

DHEAS: Dehidroepiandrosteron sülfat

FSH: Folikül uyarı horman

GABA: Gama amino bütirik asit

GalR1: Galanin reseptör 1

GalR2: Galanin reseptör 2

GalR3: Galanin reseptör 3

GPR-54: G protein bağlı reseptör-54

HPG: Hipotalamik-hipofiz-gonadal

IGF-1:İnsülin benzeri büyüme faktörü 1

IL: İnterlökin

IFN-y: y-interferon

JAK/STAT: Janus kinaz/sinyal transduser ve transkripsiyon faktörü

Kiss1r: Kisspeptin reseptörü

KO: Nakavt fareler

KOR: K-opioid reseptörü

LH: Luteinize edici hormon

LPS: Lipopolisakkaritler

MBH: Mediobasal hipotalamus

MKRN3: Makorin ring finger protein 3

MTF-1: Metal düzenleyici transkripsiyon faktörü 1

NPY: Nöropeptit Y

NKB: Nörokinin B

NK3R: Nörokinin 3 reseptörü

PAR: Poli-ADP-riboz

PEV: Periventriküler nükleus

POA: Preoptik alan

POMC: Pro-opiomelanokortin

PYY: Yapısal olarak benzer peptit YY

RP3V: Üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesi

RT-PCR: Gerçek zamanlı PCR

SLC30: Çözünmüş madde taşıyıcıları 30

SLC39: Çözünmüş madde taşıyıcıları 39

SNOC: S-nitrosistein

TAC3: Taşikinin prekursör 3

Th: T-yardımcı

TNF: Tümör nekroz faktörü

ZIP: Zrt- ve Irt- benzeri proteinler

ZnT: Çinko taşıyıcıları

ZnF: Çinko parmak

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. İştah regülasyonunda görev alan peptitler 24

Tablo 2.1. RNA-primer karışım içeriği. 35

Tablo 2.2. cDNA sentez karışım içeriği. 35

Tablo 2.3. cDNA reaksiyonu için gereken süreler. 35

Tablo 2.4. Hedef genler için kullanılan primerler. 36

Tablo 2.5. Real time pcr primer master mix içeriği. 36

Tablo 2.6. Real time pcr ısı protokolü 37

Tablo 3.1. Grupların çinko seviyeleri bulguları. 40

Tablo 3.2. Grupların kisspeptin gen ekspresyon seviyeleri bulguları. 41

Tablo 3.3. Grupların GATAD1 gen ekspresyon seviyeleri bulguları. 42

Tablo 3.4. Grupların NPY gen ekspresyon seviyeleri bulguları. 43

Tablo 3.5. Grupların GnRH gen ekspresyon seviyeleri bulguları. 44

Tablo 3.6. Grupların serum kisspeptin seviyeleri bulguları. 45

Tablo 3.7. Grupların serum GnRH seviyeleri bulguları. 46

Tablo 3.8. Grupların serum FSH seviyeleri bulguları. 47

Tablo 3.9. Grupların serum LH seviyeleri bulguları. 48

Tablo 3.10. Grupların serum Leptin seviyeleri bulguları. 49

Tablo 3.11. Grupların serum NPY seviyeleri bulguları. 50

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1. Grupların serum çinko seviyeleri bulguları 40

Grafik 3.2. Grupların kisspeptin gen ekspresyon seviyeleri bulguları. 41

Grafik 3.3. Grupların GATAD1 gen ekspresyon bulguları..... 42

Grafik 3.4. Grupların NPY gen ekspresyon seviyeleri bulguları. 43

Grafik 3.5. Grupların GnRH gen ekspresyon seviyeleri bulguları..... 44

Grafik 3.6. Grupların serum kisspeptin seviyeleri bulguları..... 45

Grafik 3.7. Grupların serum GnRH seviyeleri bulguları..... 46

Grafik 3.8. Grupların serum FSH seviyeleri bulguları..... 47

Grafik 3.9.Grupların serum LH seviyeleri bulguları..... 48

Grafik 3.10.Grupların serum leptin seviyeleri bulguları..... 49

Grafik 3.11.Grupların serum NPY seviyeleri bulguları 50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bağırsak çinko emilim ve pankreas çinko atılım mekanizmaları 4

Şekil 1.2. NPY, Gaba, AgRP nöronlarının POMC nöronları üzerine etkisi 28

Şekil 1.3. NPY, Gaba, AgRP nöronlarının POMC nöronları üzerine etkisi 28

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Maternal Çinko Eksikliği Oluşturulmuş Dişi Sıçanlarda Çinko Eksikliği ve Desteğinin Pubertal Parametreler Üzerine Etkisi

Buse GÜNAYDIN
Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2022

Vücudumuzda bulunan eser elementlerden biri olan çinko hücrede çeşitli biyokimyasal süreçlerde rol oynar. GnRH salgılanmasını indükleyen Kisspeptin ve reseptörü GPR54 üreme fonksiyonlarının ana düzenleyecisi kabul edilir. GnRH hormonun en önemli formu olan GnRH-1'in işlenmesinde çinkonun ve GnRH salgısının ergenlik öncesi baskılanmasında bazı çinko parmak proteinlerinin rolü olduğu gösterilmiştir. Özellikle GATAD1'in puberte sürecinde düzenleyici rol üstlendiği belirtilmiştir. Yine GnRH salgısıyla düzenlen LH ve FSH seviyeleri ile çinko seviyeleri arasında bir ilişkiden söz edilebilir. Yine besin alımının düzenleyicilerinden NPY ve leptinin fonksiyonları çinko ile ilişkilir. Bu çalışmanın amacı; ergenliğe girişte etkili olan bu hormonal faktörlerin ilişkilerini düzenleyen moleküler yolaklarda çinkonun olası etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden elde edilen erişkin sıçanlardan doğan yavru dişi sıçanlar üzerinde, protokolün aynı merkezin etik kurulu tarafından onaylanması üzerine gerçekleştirildi.

Gebeliği belirlenen 20 adet dişi sıçan arasından deney grubunu oluşturmak üzere 15 tanesi, gebelik başlangıcından doğum sonrası 21. güne kadar çinko eksik diyetle beslenmiştir. Kalan 5 adet sıçana ise standart sıçan yemi ile diyet programı uygulanmış ve yavrularından kontrol grubu oluşturulmuştur. Toplamda 40 adet yavru dişi sıçan üzerinde gerçekleştirilen çalışmada hayvanlar 4 gruba ayrıldı. Grup 1: Maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve devamında çinko eksik diyetle beslenen grup, Grup 2: Maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve devamında normal diyetle beslenen grup, Grup 3: Maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve devamında intraperitonel çinko takviyesi yapılan grup, Grup 4: Normal diyetle beslenmiş annelerden doğan devamında normal diyetle beslenen kontrol grubu.

45 gün süren çinko desteğini takiben genel anestezi altında sakrifiye edilen hayvanlardan alınan hipotalamus doku örneklerinde gerçek zamanlı PCR yöntemiyle GATAD-1 geninin, kisspeptinin, GnRH, NPY translasyonundan sorumlu genlerin ekspresyon düzeyleri tayin edildi. ELISA yöntemiyle ise serum Kisspeptin, GnRH, FSH, LH, Leptin, NPY düzeyleri, sıçan kiti kullanılarak belirlenirken spektrofotometrik yöntemle ise serum çinko düzeyleri tayin edildi.

Yapılan PCR testi sonuçlarına göre; GATAD1, kisspeptin, NPY gen ekspresyon düzeyleri gruplar arasında anlamlı olarak en yüksek grup 3 ve grup 4'de tayin edildi ($p<0,05$). Grup 3 ve grup 4 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. GnRH gen ekspresyon düzeyi ise, grup 3 ve grup 4'te diğerlerine kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0,05$), bu iki grup arasında önemli bir farklılık yoktu. Bunun yanı sıra, en düşük GnRH gen ekspresyon seviyesi grup 1'de tayin edildi ($p<0,05$). Elisa test sonuçlarına göre; serum kisspeptin, GnRH, LH, leptin seviyeleri en düşük grup 1'de görüldü, en yüksek seviyeler ise grup 3 ve grup 4'de görüldü ($p<0,05$). Grup 3 ve grup 4 arasında ise önemli bir farklılık bulunamadı. Serum FSH seviyeleri grup 1 ve grup 2'de en düşük seviyede bulunurken ($p<0,05$), aralarında ise anlamlı bir fark yoktu. Yine grup 3 ve grup 4'de en yüksek seviyede bulunurken ($p<0,05$), aralarında ise anlamlı bir fark yoktu. Serum NPY seviyeleri gruplar arasında en yüksek grup 1'de tayin edildi ($p<0,05$). En düşük seviyeler ise, grup 3 ve grup 4'te görüldü ($p<0,05$). Grup 3 ve 4 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde, maternal çinko eksikliği oluşturulan ve devamında çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda puberteye girişte etkili olan hormonlardan GATAD1, GnRH, NPY ve kisspeptinin gen ekspreyon düzeyinin azaldığı bunun da çinko desteği ile

restore edildiği görülmüştür. Ayrıca kisspeptin, GnRH, FSH, LH, leptin ve NPY hormonlarının serum seviyeleri incelendiğinde, maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve devamında çinko eksik diyetle beslenmiş sıçanlarda hormonların seviyeleri çinko desteği ile düzenlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Beslenmenin düzenlenmesi; Çinko eksikliği; Ergenlik; Maternal çinko eksikliği.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

The Effect of Zinc Deficiency and Supplementation on Pubertal Parameters in Female Rats with Maternal Zinc Deficiency

Buse GÜNAYDIN
Department of Physiology (Medicine)

MASTER THESIS / KONYA-2022

Zinc, one of the trace elements in our body, plays a role in the biological processes in the cells. Kisspeptin that induces GnRH secretion and receptor of kisspeptin are known that main regulator of reproduction functions. It has been shown that zinc in the processing of GnRH-1, the most important form of the GnRH hormone, and some zinc finger proteins play a role in the suppression of GnRH secretion before puberty. Especially GATAD1 plays prominent roles in the puberty processes. Again, it can be mentioned that there is a relationship among zinc levels and LH and FSH levels regulated by GnRH secretion. Also, NPY and leptin, one of the nutritional intake regulators, are associated with zinc. The purpose of this study was to investigate the possible effects of zinc in molecular pathways regulating the relationships of hormonal factors that are effective in entering puberty.

The study was carried out on female juvenile rats born from adult rats obtained from Selcuk University Experimental Medicine Research and Application Center, after the protocol was approved by the ethics committee of the same center.

Among the 20 female rats whose pregnancy was determined, 15 of them were fed with a zinc deficient (28.20 mg/kg zinc) diet from the beginning of pregnancy until the 21st day after birth to form the experimental group. The remaining 5 rats were given a diet program with standard rat chow and a control group was formed from their offspring. In the study carried out on 40 female baby rats, the animals were divided into 4 groups. Group 1: The group with maternal zinc deficiency and subsequently fed with a zinc-deficient diet, Group 2: The group with maternal zinc deficiency and subsequently fed with a normal diet, Group 3: The group with maternal zinc deficiency followed by intraperitoneal zinc supplementation, Group 4: A control group consisting of mothers fed a normal diet followed by a normal diet.

Expression levels of GATAD1 gene, kisspeptin, GnRH, NPY translation genes were determined by real-time PCR method in hypothalamus tissue samples taken from animals sacrificed under general anesthesia after 45 days of zinc supplementation. While serum Kisspeptin, GnRH, FSH, LH, Leptin, NPY levels were determined by ELISA method using rat kit, serum zinc levels were determined by spectrophotometric method.

According to the results of the PCR test; GATAD-1, kisspeptin, NPY gene expression levels were found to be significantly higher in group 3 and group 4 ($p<0.05$). No statistically significant difference was found between group 3 and group 4. GnRH gene expression level was found to be significantly higher in group 3 and group 4 compared to the others ($p<0.05$), but there was no significant difference between these two groups. In addition, the lowest GnRH gene expression level was determined in group 1 ($p<0.05$). According to Elisa test results; The lowest serum kisspeptin, GnRH, LH, and leptin levels were observed in group 1, while the highest levels were observed in group 3 and group 4 ($p<0.05$). No significant difference was found between group 3 and group 4. While serum FSH levels were lowest in group 1 and group 2 ($p<0.05$), there was no significant difference between them. Again, while it was at the highest level in group 3 and group 4 ($p<0.05$), there was no significant difference between them. The highest serum NPY levels among the groups were determined in group 1 ($p<0.05$). The lowest levels were observed in group 3 and group 4 ($p<0.05$). No statistically significant difference was found between groups 3 and 4.

When the results of our study were evaluated, it was observed that the gene expression level of the hormones GATAD1, GnRH, NPY and kisspeptin, which are effective at puberty, decreased in rats fed with a zinc-deficient diet, and this was restored with zinc supplementation. In addition, when the serum levels of kisspeptin, GnRH, FSH, LH, leptin and NPY hormones were examined, , the levels of hormones were regulated by zinc supplementation in rats created maternal zinc deficiency and subsequently fed a zinc deficient diet.

Key words: Regulation of nutrition; Zinc deficiency; Puberty; Maternal zinc deficiency.

1. GİRİŞ

Vücudumuzda bulunan eser elementlerden biri olan çinko birçok enzimin yapısına katılarak; hücre sinyali, gen ekspresyonu, hücre membran yapısı ve fonksiyonu, hücrenin redoks durumunun düzenlenmesi gibi çeşitli biyokimyasal süreçlerde rol oynar. Hücre düzeyindeki işlevleriyle immün sisteminin etkinliğinde, sinir sistemi gelişiminde, organizmanın üreme ve gelişmesinde önemli rol oynar.

Hipotalamik GnRH'ın (gonadotropin salgılatıcı hormon) en önemli formu olan GnRH-1'in işlenmesinde çinkonun rolü olduğu gösterilmiştir (Orlowski ve ark 1983). Ön hipofizden LH (luteinize edici hormonun) ve FSH'ın (folikül uyarıcı hormon) pulsatil sekresyonuna yol açan GnRH'nin hipotalamik pulsatil salgılanması ergenliğe giriş kabul edilir. GnRH salgılanmasını indükleyen kisspeptin, reseptörü GPR54'e (G-protein bağlı reseptör 54) bağlanarak hücre içinde bir dizi reaksiyona neden olur ve üreme fonksiyonlarının ana düzenleyicisi kabul edilir. Besin alımının düzenleyicilerinden NPY (nöropeptit Y), leptin hormonu ve yine çinko parmak proteinleri özellikle GATAD1 bu mekanizmayı etkilemektedir. Leptin hormonunun pubertel gelişim için önemini destekleyen çalışmalardan birinde, farelere puberte öncesi küçük dozlarda leptin verilmiş ve bu hormonun cinsel olgunlaşmayı ilerlettiği bildirilmiştir (Gueorguiev ve ark 2001). Yine leptin hormonunun GnRH salgısını doğrudan uyardığı da bilinmektedir. Çinko eksikliğinin ve takviyesinin serum leptin düzeyini değiştirdiği ve puberteye girişte etkisinin olabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. GATAD1, N-terminalinde ZnF (çinko parmak) domain içeren ve 7q21–q22 kromozal alanda konumlanmış GATA tipi bir çinko parmak proteinidir. GATAD1'in ARC'de (arkuat nükleus) eksprese edilen ve GnRH sekresyonunun merkezi kabul edilen Kiss1 ve Tac3'ün (Taşikinin prekursör 3) doğrudan transkripsiyonel baskısını gerçekleştirdiği belirtilmiştir. GATAD1'in pubertal sürecin bir regülatörü olduğu, sıçan ARC'nin kisspeptin nöronlarında tespit edilen GATAD1 transkriptleri ile kanıtlanabilir. Sonuç olarak, ergenliğe girişte çinkonun; NPY, leptin, GnRH, FSH, LH, GATAD1 ve kisspeptin üzerine etkisi olduğu söylenebilir.

Bu çalışmanın amacı; ergenliğe girişte etkili olan hormonal faktörlerin ilişkilerini düzenleyen moleküler yolaklarda çinkonun olası etkilerinin araştırılmasıdır.

1.1. Çinko

Çinko vücudumuzda çeşitli sıvılarda, dokularda bulunan bir eser elementtir. Eser elementler, vücudumuzun fizyolojik fonksiyonlarının optimal düzeyde gerçekleşmesi için gereklidir. Genellikle her biri vücut kitlesinin %0.01'inden daha azını oluşturan, toplam miktarları ise vücut kütlesinin <%1'ini oluşturan minerallerdir (Strachan 2010). İnsan vücudunda en fazla bulunan eser metal demirdir. Fakat, hemoglobine bağlanan demir dikkate alınmazsa çinko en fazla bulunan geçiş metali olur. Heksagonal mavimsi beyaz renkte olan ve 30 atom numarasına sahip olan çinko, 65,4 atom ağırlığında bir elementtir. Bunlarla birlikte çinkonun erime noktası 420 ˚C, kaynama noktası 907 ˚C'dir. Çinkonun hayvanlar için önemi ilk kez Todd ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmasıyla kanıtlanmıştır ve çinkonun normal büyüme ve gelişim için gerekli olduğunu savunmuşlardır (Todd ve ark 1933).

1.1.1. Çinko Kaynakları

Depo yeteneği kısıtlı olan çinkonun birincil kaynağı diyettir. Vücut iç dengesi için ek takviyesi gereklidir. Kabuklu deniz ürünleri özellikle istiridye, kırmızı et ve karaciğer, kümes hayvanları, yumurta, süt ürünleri, balık çinko bakımından zengin kaynaklar olup biyoyaralanımları yüksektir (Hotz ve ark 2003). Çinko, nötr Ph seviyelerinde proteinlere güçlü bir şekilde bağlanır ve bağırsak hücreleri yoluyla taşınması yani emilimi kolaylaşır. Ph seviyelerinin de korunmasında önemli tampon mekanizması olan protein alımı önemlidir (Sandström ve Lönnerdal 1989). Örneğin, kazein açısından zengin inek sütü, insan sütüne kıyasla protein bakımından üç kat daha zengindir. İnek sütünün bu fazla yüksek protein içeriği Ph seviyesini arttırıp insan sütüne kıyasla çinkonun emiliminin zorlaşmasına ve sonunda biyoyararlanımının azalmasına neden olur (Roth ve Kirchgessner 1985). Tohumlu ve kabuklu yemişler, baklagiller, tahıllar ve soya bazlı ürünleri de çinko bakımından zengindir ancak biyoyararlanımları azdır. Bu ürünler inositolheksa ve pentafosfatlar gibi organik fosfatlar yani fitat içerir. Fitatın yanı sıra bazı diyet lifleri, lignin ve Maillard reaksiyonlarının ürünleri gibi sindirilemeyen bitki ligandları çinkoyu bağlar, emilimini azaltır (Sandstead ve Smith Jr 1996). Ayrıca kalsiyum da çinko emilimini engelleyebilir ve fitatların çinkonun emilimi üzerindeki inhibisyonunu arttırır (Oberleas ve ark 1966, Ferguson ve ark 1989). Bu nedenle diyetteki fitat/çinko ve

fitat/kalsiyum: çinko molar oranları çinko eksikliği riskini öngörmektedir (Ferguson ve ark 1989, Gibson ve Ferguson 1998). Çinko biyoyararlanımını etkileyen diğer faktörler arasında yüksek konsantrasyonlarda demir (Solomons 1986) ve folik asitin farmakolojik alımları yer alır (Milne ve ark 1984, Simmer ve ark 1987). Yine yapılan bazı çalışmalarda histidin, metiyonin, glutamat, glisin gibi aminoasitlere bağlanan veya sitrat, askorbat, pikolinat, propriat gibi düşük moleküler ağırlığa sahip ligandlara bağlanan çinkonun serbest formdaki çinkoya kıyasla emilim oranlarının daha fazla olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu kompleks oluşumunun diyet kalsiyum veya fitattan daha az etkilendiği gösterilmiştir (Dutta ve ark 1998, Lowe ve Wiseman 1998, Lonnerdal 2000).

1.1.2. Vücutta Çinko Dağılımı

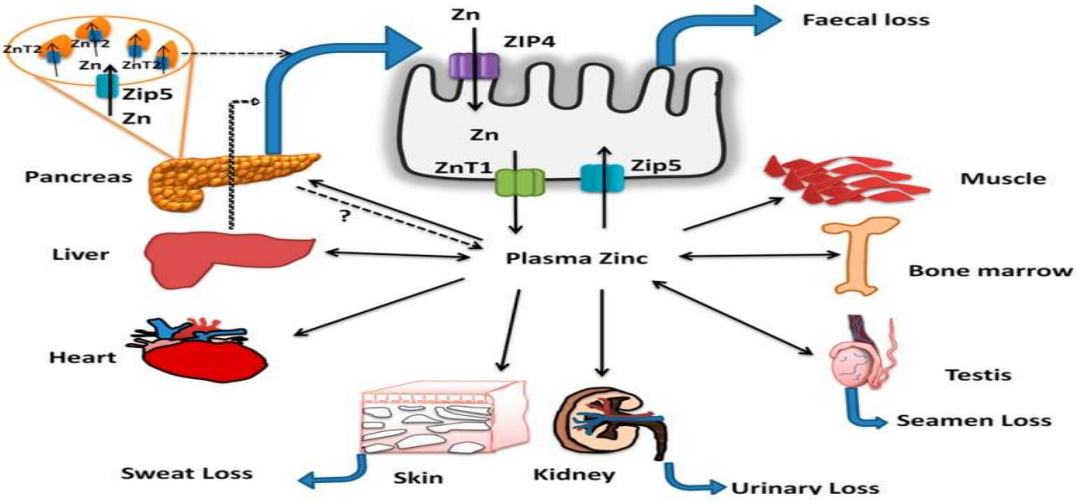
Çinko vücudumuzun tüm dokularında, organlarında bulunurken aynı zamanda vücut sıvılarında ve sekresyonlarda da bulunur. Toplam vücut çinko konsantrasyonun yaklaşık %85'i iskelet kası, kemikler ve dişlerde depolanır. Geriye kalan %11'lik kısmı ise karaciğerde ve deride bulunur. Plazma çinko içeriği toplam çinkonun yalnızca %0,1'ini temsil eder (Prasad 1991) ancak, çinko seviyelerinin stabil aralıkta tutulması yani bu oranın korunması için bu değer çok önemlidir. Plazma çinkonun çoğu plazma proteinlerinden albümine, α-2 makroglobuline, transferrin-seruloplazmine sırasıyla %60, %30, %10 oranında düşük afinite ile gevşek bir şekilde bağlanmıştır (Rink 2000). Yine plazma çinkonun %90'ı metalloenzimlerle ilişkili, özellikle karbonik anhidraz ve Cu/Zn SOD (bakır/çinko süperoksit dismutaz), eritrositlerde bulunur (Vallee ve Falchuk 1993). Tüm vücut çinkonun ise %95'inden fazlası intraselüler proteinlere ve hücre membranlarına bağlı bir şekilde bulunur. Hücre içinde dağılım ise sitozol %50, çekirdek %40, plazma ve organel membranları %10 şeklindedir.

1.1.3. Çinko Taşıyıcıları ve Çinko Emilimi

Çinko emilimi ve atılımı arasındaki denge çinko homeostazını korumak için temel ve önemli mekanizmalardır. Bu homeostatik mekanizmalar, plazma çinko konsantrasyonunu 10-18 μmol/L aralığında tutmak için çalışırlar (Foster ve Samman 2012). Fakat bu aralıktaki değişimler vücut çinko içeriğinin eksikliğini belirlemede yetersizdir çünkü plazma çinko değerleri toplam vücut çinkosunun sadece %0,1'ine

karşılık gelir. Olası çinko eksikliğinden etkilenen bağışıklık hücreleri bile, plazma çinkodan önce yanıt verebilir.

Çinko duodenuma girdikten yaklaşık 3 saat sonra transselüler yolla emilir ve plazmaya geçer. Emilim özellikle jejunumda gerçekleşirken yemek sonrası yüksek çinkoya maruziyet varsa duodenumda da gerçekleşir (Condomina ve ark 2002). Plazmaya geçen çinkonun çoğu plazma proteinlerine bağlanırken çok az bir kısmı serbest formdadır. Atılım ise esas olarak gastrointestinal sistemden gaita yoluyla sağlanır. Bir miktarı da idrar ve ter yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Plazma çinko seviyesinde azalma veya diyetle çinkonun yetersiz alımı durumunda, gaita yoluyla çinko atılımı azalır bağırsak emilimi ise artar. Bu durum hem dokularda hem de plazma çinko konsantrasyonu fizyolojik sınırlarda tutmak için çok önemlidir (Woodhouse ve ark 1997, King ve ark 2000, Liuzzi ve Cousins 2004). Aynı zamanda çinko eksikliği durumlarında, karaciğer, kemik iliği ve testis gibi dokulardan plazmaya çinko sekresyonu gerçekleşir ve böylelikle çinko seviyesi başka mekanizmalarla da korunmuş olur. Kalp, iskelet kası, deri ve böbrek gibi dokularda ise sekresyon gerçekleşmez yani doku çinko seviyeleri korunur. Çinko fazlalığı gerçekleşecek olursa, emilim etkilenmez fakat gaita yoluyla fazla çinko vücuttan uzaklaştırılmaya çalışılır. Bağırsak çinko emilimi ile ilgili mekanizmalar ve pankreasın endojen çinko atılımındaki spesifik rolü aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Bağırsak çinko emilim ve pankreas çinko atılım mekanizmaları (Vallee ve Falchuk 1993)

Memeli çinko taşıyıcıları, hücre yüzeyinde veya organellerin plazma membranlarında ifade edilmiş olup iki tip çinko taşıyıcısı tanımlanmıştır (Kambe ve ark 2004). Bunlar: Çinko taşıyıcı (ZnT) (Palmiter ve Huang 2004) ve Zrt-Irt benzeri protein (ZIP)'dir (Jeong ve Eide 2013). Şimdiye kadar 10 ZnT ve 14 ZIP homologu tanımlanmış, bunlar insanlarda sırasıyla SLC30A1-10 ve SLC39A1-14 genleri tarafından kodlandığı bildirilmiştir (Kambe ve ark 2004). Tüm çinko taşıyıcıları seçici çinko bağlama yeteneği gösterir, ancak ZnT'lerde ve ZIP'lerde bağlanan çinko taşımaları zıt yönlerde gerçekleşir. ZnT'ler sitoplazmadaki fazla çinkonun çıkarılmasından sorumlu taşıyıcılarken ZIP'ler sitozolik çinko seviyesine arttıran taşıyıcılarıdır (Rosenzweig 2002). Taşıyıcı proteinler vasıtayla gerçekleşen çinko hareketi, transmembran elektrokimyasal gradyanlar boyunca yönlendirilen enerjik bir süreçtir. Bu taşıyıcılar koordineli olarak çinko homeostazını kontrol eder. Taşıyıcılar tarafından sitozole taşınan çinko iyonları spesifik hücresel süreçlerde yer alır. Bu nedenle, çinko taşıyıcılarının sinyal iletim mekanizması, devamında gerçekleşen spesifik fizyolojik tepkiler, hücre içi ve hücre dışı alanda çinko homeostazına katkıda bulunan "çinko sinyali" olarak kabul edilir (Vallee 1995, Palmiter 2004). Çinko taşıyıcılarının gen ifadesi, her organel için karakteristik bir modele sahiptir ve her molekülün farklı fizyolojik fonksiyonları (Lichten ve Cousins 2009, Fukada ve Kambe 2011, Kambe ve ark 2015, Kimura ve Kambe 2016) modüle ettiği bildirilmiştir. Kısacası, çinko taşıyıcı tarafından taşınan çinko, bir çinko sinyali olarak görev yaparken aynı zamanda hücre içi süreçlerin ve devamındaki fizyolojik cevapların kontrolünde rol alır. Son on yılda, insan genetik analizleri ve genetiği değiştirilmiş fareler, nakavt (KO) ve koşullu nakavt (cKO) fareler, üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar çinko taşıyıcıları ve insan hastalıkları arasında güçlü ilişkiyi ortaya koydu.

İnsan çinko taşıyıcılarından ZnT1 ve ZIP4, çinkonun emilim mekanizmasının anlaşılmasında büyük bir role sahiptir. Her ikisi de enterositlerin apikal membranında bulunur. Enterositlerin iç yüzeyini kaplayan zarlarında çinko taşıyıcıları bulunur. Diyet çinko, polarize enterositlere apikal membrandan girer, ardından bazolateral taraftaki plazmaya salınır. Trans-epitelyal çinko hareketi, ZnT1, ZnT2, ZnT4, ZnT5, ZnT6, ZnT7, ZIP4 ve ZIP5 (Wang ve Zhou 2010) dahil olmak üzere birçok memeli çinko taşıyıcısının koordineli işlevleri tarafından düzenlenir. Bunlar arasında ZIP4 ve ZnT1, sırasıyla apikal ve bazolateral membranda lokalize olan

taşıyıcılardır (Kambe ve Andrews 2009, Nishito ve Kambe 2019). Zıt çinko taşıma yönleri ve farklı yüzey zarlarında uzamsal ayrışma, vektörel çinko hareketini bağırsak lümeninden kana yönlendirmede önemli bir rol oynamalarına izin verir. Apikal ve bazolateral membranlardan geçen çinko akışlarının, hücre içi çinko homeostazını korumak için dengelenmesi gerekirken, net trans-epitelyal çinko akışı da diyet çinko dalgalanmaları karşısında sistemik çinko homeostazını sürdürmek için düzenlenir. Sonuç olarak, ilgili hücre yüzeylerinde ZIP4 ve ZnT1'in miktarı çinko varlığına göre sıkı bir şekilde düzenlenir. Çinko eksikliği, ZIP4'ün yüzey zarında birikmesine neden olur (Dufner-Beattie ve ark 2003, Kim ve ark 2004, Wang ve ark 2004, Mao ve ark 2007, Weaver ve ark 2007). Öte yandan, hücre dışı çinko seviyelerinin yükselmesi, yalnızca ZIP4'ün internalizasyonunu indüklemekle kalmaz, aynı zamanda proteazomal ve lizozomal bozunma yolları yoluyla hücresel ZIP4'ün büyük ölçüde uzaklaştırılmasını da tetikler (Weaver ve ark 2007). Normal kültür koşulları altında, ZIP4 hücre yüzeyi ekspresyonunun düşük seviyesini korumak için sürekli olarak internalizasyona uğrar (Weaver ve ark 2007). Bu nedenle, ZIP4 tarafından apikal membran boyunca çinko alımı, esas olarak ZIP4 internalizasyonunun inhibisyonuyla kontrol edilir. Hücre dışı çinko seviyesi bir eşiğe ulaştığında, çinko sensörleri gibi yardımcı yapısal bileşenlerin oluşturduğu sinyalle, inhibisyon ortadan kalkar ve ZIP4 endositozunu etkinleştirir. Çinko için en önemli atılım yolu olarak pankreas yıllardır çalışılmaktadır (Liuzzi ve ark 2004, Guo ve ark 2010). Pankreasın asiner hücreleri, çinko metalloenzimlerinin, asidik ortamda çinko iyonları ile paketlendiği zimojen granülleri üretir. Bu granüller içerisinde sindirim enzimlerinin barındırır ve bu enzimlerin aktivasyonu için çinko gerekli bir eser elementtir. Bunun yanında asiner hücreler çinko homeostazının devamı için de önemlidir. Diyet çinko kısıtlaması, sekresyonlardaki çinko konsantrasyonunu azaltırken aynı zamanda pankreatik dokuda da çinko eksikliğine neden olur (Williams ve Mills 1970, Condomina ve ark 2002). Bu durumda; asiner hücreler, bazolateral membranlarında lokalize olan ZIP5'i eksprese eder ve çinkonun pasif bir taşıyıcısı olarak işlev görebilir. Asiner hücreler ayrıca MTF-1 (Metal düzenleyici transkripsiyon faktörü 1) aracılı bir süreçle ZnT1 ve ZnT2 üretir (Guo ve ark 2010). Bunlar sırasıyla plazma membranında ve zimojen salgı granüllerinde çinko salınımına katılırlar. Pankreasın çinko homeostazında kesinlikle bir rolü vardır, ancak tüm bileşenler tanımlanmamış olabilir.

Gastrointestinal sisteme endojen çinko salınımı için diğer potansiyel yol, çinkonun serozalden mukozaya taşınması ve nihai olarak bağırsak lümenine salınmasıdır. Sıçanlarda bu yönde çinko transferi gösterilmiştir (Cousins 1989). İnsanlarla yapılan izotopik izleyici çalışmaları, bağırsaklara salgılanan büyük miktarlarda endojen çinkonun salınmasını da destekler (King ve ark 2000). Bu izleyici çalışmalarıyla çinkonun bağırsak hücrelerinden mi yoksa pankreas asiner hücrelerinden mi taşındığını belirlemek mümkün değildir.

Yukarda açıklanan durumlar, entero-pankreatik eksen yolunu kullanarak çinko homeostazisinin düzenlenmesine aracılık ederler.

1.1.4. Çinkonun Biyokimsayal Reaksiyonları

Çinko; vücutta serbest halde (Zn^{+2}) bulunabilir ancak demir gibi diğer metallerin aksine, serbest formdaki çinko fizyolojik koşullarda oksidasyon indirgeme reaksiyonlarını tetiklemez ve nispeten toksik değildir. Serbest haldeki çinko proteinlerin ve polipeptitlerin sistein ve histidin kalıntılarındaki kükürt ve azot atomlarına rahatlıkla bağlanabilir ve bir veya daha fazla polipeptidi çapraz bağlayıp üçüncül yapı ve işlevi değiştirir. Memeli genomunda kodlanan proteinlerin yaklaşık %10'unun uygun yapı ve işlevde olması için çinko gereklidir (Vallee ve Falchuk 1993, Andreini ve ark 2006).

Karbonhidrat, protein, lipit ve nükleik asit metabolizması da 70'ten fazla çinko metalloenzim gerektirir (Colombini 1999). Diğer çinko metalloproteinler, hücre sinyali, gen ekspresyonu, membran yapısı ve fonksiyonu ve hücrenin redoks durumunun modüle edilmesi ve hücresel solunum gibi vücut için hayati fonksiyonlarda görev alır.

Çinko; DNA ve RNA polimerazın da içinde olduğu 7200 enzim (Mason 2016), TFIIIA, GATA 6 ve DM gibi birçok parmak proteini (Laity ve ark 2001) yapısında bulunurken metalloproteinazların bağlanması, biyolojik membran stabilizasyonu, çeşitli ajanların hücresel hasarından kaynaklanan homeostaz, mitoz ve apopitoz gibi birçok süreçte de önemli aktivitelerde bulunur. Yapılan çalışmalarla bu elementin DNA bütünlüğünü koruduğunu ve eksikliğinde olası DNA hasar yanıtında yer alan çinkoya bağımlı proteinlerin işlevinin bozulabileceği gösterilmiştir (Yan ve ark 2008). Yine, çinko eksikliğinin artan inflamatuar sitokin konsantrasyonu

ve oksidatif stres ile sonuçlandığını bunun da apopitoza ve devamında hücre fonksiyon bozukluğuna neden olduğu gösterilmektedir. Bunlara dayanarak, çinkonun anti inflamatuar etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

Tiroid hormonlarının, androjenlerin ve özellikle büyüme hormonlarının metabolizması çinko eksikliğinden etkilenir (Favier 1992). Büyüme hormonu sentezi, salgılanması ve hepatik IGF-I (insülin benzeri büyüme faktörü 1) sentezi üzerindeki etkisi sayesinde çinko, dolaşımdaki IGF-I seviyelerini arttırır ve IGF-I membran sinyalini ve hücre proliferasyonunu indükleyen hücre içi ikinci habercileri güçlendirir (MacDonald 2000, Salgueiro ve ark 2002). Çinko eksikliği sıçan modellerinde serum büyüme hormonu seviyeleri, büyüme hormonu reseptörleri ve hepatik büyüme hormonu ile indüklenen IGF-I üretimi azalmıştır (MacDonald 2000). Çinko tiroid ve steroid hormon reseptörlerinin fonksiyonu için gereklidir. Leydig hücrelerinin testosteron üretmesi ve biyolojik olarak aktif 5-α dihidrotestosterona enzimatik dönüşüm için çinko gereklidir. İnsanlarda çinko eksikliğinin tiroid hormonu seviyelerini ve dinlenme metabolik hızını azalttığı görülmektedir (Maxwell ve Volpe 2007). Hipotiroidizm çinko bağlayıcı ligandları azaltarak çinko emilimini düşürür (Logas ve ark 1993). Çinko eksikliği, hipotalamik-hipofiz-adrenal ekseni aktive ederek glukokortikoidlerin sürekli üretimine neden olur.

Epidermiste dermisten daha yüksek konsantrasyonda bulunan çinko deride de önemli rollere sahiptir. Keratinositler içinde çinko, tümör nekroz faktörü-alfa aktivasyonunu baskılar ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve nitrik oksit üretimini azaltır (Maxfield ve Crane 2020). Bununla birlikte, kaspaz-3'ün aktivasyonu hücre içi çinko şelasyonu ile oluşur devamında ise keratinositlerin apopitozu ile DNA fragmantasyonu meydana gelir (Maxfield ve Crane 2020). Normal keratinosit proliferasyonu için bu olaylar dizisinin olması gereklidir.

Çinko normal beyin gelişimi ve fonksiyonu için gereklidir. Çinko kan-beyin ve kan-BOS bariyerini aşarak beyne taşınır (Takeda 2001). Beyindeki çinkonun çoğu çinko metalloproteine bağlı olsa da geri kalanı nöronların presinaptik vezikülleri içerisinde özellikle hipokampüs, piriform korteks, amigdala ve olfaktör bulbus içinde iyonik formda bulunmaktadır (Takeda 2001). Bu nöronlar veziküllerinden hem çinko hem de glutamat salgılar ve gluzinerjik nöranlar olarak adlandırılır (Frederickson ve ark 2005). Salınan çinko, postsinaptik glutamaterjik uyarıcı N-metil ve D-aspartat

reseptörlerinin inhibitör nöromodülatörü olarak işlev görür (Colvin ve ark 2000). Sonuç olarak bu nöronlarda gelişen çinko eksikliği hafıza, davranış, bilişsel işlemler ve koku alma anormallikleri ile ilişkilendirilmiştir (Takeda 2001). Kemirgenlerde yapılan çalışmalar beyinde çinko konsantrasyonunun azalması ile nöbet eşiğinde düşme arasında bir korelasyon bulmuştur (Sandstead 2000, Sandstead ve ark 2000, Takeda 2001). Yine benzer şekilde erken gelişim sırasında, çinko eksikliğinin deney hayvanlarında beyin malformasyonlarına neden olduğu saptanmıştır (Sandstead ve ark 2000).

Çinko; bağışıklı sistemi için de önemlidir. Çinko eksikliğinin araştırılmasında hayvan modellerini kullanan çalışmalar, azalan seviyelerinin timik atrofi, lenfopeni ve hücre ve antikor aracılı bağışıklık tepkilerini indüklediğini bulmuşlardır. Ayrıca, T-lenfositlerin aktivasyonu ve regülasyonu, Th1 sitokin üretimi, B-lenfosit fonksiyonu ve sonuçta immünoglobülin G oluşumu için gereklidir. Doğal bağışıklığa ise doğal öldürücü hücrelerin ve nötrofillerin fonksiyonuyla katkı sağlar. Makrofajların fagositoz, hücre içi öldürme ve sitokin üretimi gibi fonksiyonları için çinko gereklidir.

Karsinom durumlarında oluşabilen çinko eksikliğinin timus atrofisine neden olduğu bilinmektedir. Timusta antitümör özelliği gösteren T hücreleri gelişir. Ayrıca, glukokortikoidler, özellikle kortikosteron, çinko eksikliği olan farelerde kronik olarak yükselir (Fraker 1979, DePasquale-Jardieu ve Fraker 1980). Bunlara ek olarak çinkodan yoksun diyetler, glukokortikoidlere yanıt olarak yüksek apopitoz özelliği gösteren $CD4^+$, $CD8^+$ timositlerinin sayısında önemli azalmalara neden olur (King ve ark 2002). Bu nedenle, Zn eksikliği olan bireylerde glukokortikoidlerin de etkisiyle, timusta apopitoz oranını hızlanabilir ve devamında periferik T hücrelerinin sayısını azalabilir. Olgunlaşmış $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreleri ise, çinko eksikliğine dirençlidir ve atrofik bir timusta canlılığını korurlar. İlginç bir şekilde, deneysel bir fare modelinde Zn eksikliğinin T-yardımcı (Th) 1 ve Th2 hücrelerinin çevresel fonksiyonları arasında bir dengesizliğe neden olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda Th1 hücrelerinin ürünleri olan y-interferon (IFN-y) ve interlökin (IL)-2 üretimi azalırken Th2 hücre ürünleri IL-4, IL-6 ve IL-10 üretimi etkilenmemiştir (Prasad 2000). Sonuç olarak, çinko Th1 hücrelerinin aktivasyonunda ve tümör baskılanmasında önemli bir yere sahiptir.

Çinko, monositlerden LPS (lipopolisakkaritler) kaynaklı tümör nekroz faktörü (TNF)-α ve IL-1β salınımını baskılar. Bu inhibitör etki, siklik nükleotitlerin 5′-nükleotit monofosfata fosfodiesteraz aracılı hidrolizinin baskılanmasına ve ardından hücre içi cGMP seviyesinin artmasına bağlıdır. NO donör olan S-nitrosistein (SNOC)'ye yanıt olarak hücre içi serbest çinko seviyesi artar. Yine SNOC LPS ile indüklenen TNF-α ve IL-1β salınımını da inhibe eder. Bu inhibisyondan sorumlu mekanizma ise, artan çinko seviyelerinin cGMP seviyesinin arttırılmasıdır (von Bülow ve ark 2005). Sitokinler, NO üretimini indükler ve sonucunda artan çinko (Spahl ve ark 2003) NO ve cGMP'nin aracılık ettiği ikincil haberleşmeler arasında bir köprü görevi görebilir.

Bütün bu çinko fonksiyonları mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar ve tabi ki insanlar için hayati bir öneme sahiptir (Bedwal ve ark 1991, Bedwal ve Bahuguna 1994).

1.1.5. Çinko Parmak Proteinleri

Protein-protein ve protein-nükleik asit etkileşimleri birçok hücresel işlev için gereklidir. Bu moleküllerin bağlanması için farklı yolların bulunduğu ve bu yollardan birinin de ZnF olarak bilinen çinko bağlayıcı tekrarlar olduğu belirtilmiştir. Bu tekrarlar bir moleküler yapı iskeletidir. İlk olarak Xenopus oositlerinde transkripsiyon IIIA'da DNA'nın bağlanmasından sorumlu bir çinko bağlama alanı tanımlanmıştır. Günümüzde artan çalışmaların ışığında, DNA, RNA veya proteini bağladığı bilinen çok sayıda ZnF protein üst ailesi vardır.

Çinko parmak içeren proteinler yani çinko parmak proteinleri, vücudumuzda çokca bulunan protein gruplarından biridir (Cassandri ve ark 2017). ZnF proteinler; transkripsiyonel düzenleme, ubikuitin aracılı protein bozunması, sinyal iletimi, aktin hedefleme, DNA onarımı, hücre göçü gibi hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde DNA, RNA, PAR (poli-ADP-riboz) ve diğer proteinlerle reaksiyona girerek rol oynar.

Yapıları, bağlama şekilleri ve afinitelerine göre ZnF motifleri sınıflara ayrılmıştır. Bu motifler bir veya daha fazla çinko atomunu koordine edebilir. Aynı sınıfın üyelerinden bazıları DNA'yı bağlarken diğerleri proteini bağlar. Bu durum bize, ZnF motiflerinin bağlanma metotlarında önemli ölçüde değişiklik sergiledikleri

ve kendilerine özgü fonksiyonlar geliştirmiş kararlı bir iskelet elemanları olduğu yorumunu yaptırabilir. Kararlı yapıları gereği hedeflerine bağlandıkları zaman nadiren konformasyonel değişikliklere uğrarlar. ZnF proteininlerin çoğu, çok sayıda parmak benzeri çıkıntılar içerir. Bu çıkıntılar, genişletilmiş substratları tanır ve bağlanacakları molekül ile ardarda temaslar yapar. Yapısal olarak tanımlanmış birkaç ZnF proteinleri aşağıda açıklanmıştır (McDowall 2007).

Klasik (C2H2) ZnF motifleri; bu motifler bir beta firkete ve bir alfa sarmalı (beta/beta/alfa yapısı) içerir, tek bir çinko atomu Cys(2)His(2) (C2H2), Cys(2)HisCys (C2HC) ya da Cys(3)His (CCCH) kalıntıları tarafından yerinde tutulur. Ökaryotik transkripsiyon faktörleri arasında en yaygın bulunan motiflerdir (McDowall 2007).

RanBP tipi ZnF motifleri; bu motifler, iki kısa beta firketesinden oluşur. Bu yapı çinko-şerit kıvrımına benzer ve tek bir çinko atomunu bağlar (sandviçler). Bu alanlar ilk olarak ZnF alanlarının ubiquitin ile temas halde olduğu bilinen nükleer transport proteini RanBP2'de tanımlandı.

A20 tipi ZnF motifleri; bu motifler ilk olarak protein A20'de tanımlanmış tek çinko atomu bağlayan motiflerdir. Tıpkı RanBP gibi ubiquitin ile bağlandıkları fakat bağladıkları bölgenin RanBP'nin bağlandığı bölgeden farklı bir bölge olduğu bilinmektedir.

LIM tipi ZnF kalıpları; GATA benzeri ZnF'lere benzeyen LIM alanları, bir ya da daha fazla çinko atomunu koordine eder. Çinko atomunu tutan kalıntılar Cys, His, Asp veya Glu kalıntılarını içerir ve iki çinko bağlayıcı motiften oluşurlar. LIM tipi ZnF motifleri, hücre iskelet elemanlarının gelişimi ve organizasyonunun yanı sıra gen ekspresyonu da dâhil çeşitli işlevleri olan proteinlerde yer alır.

GÖRÜNTÜ tipi ZnF motifleri; bu motiflerin MYND alanları (Miyeloid translokasyon proteini, Nervy ve DEAF-1) ki ilk bulundukları üç proteinden isim almışlardır, iki çinko atomunu koordine eder. Yapısal olarak kısa bir beta firkete ve iki kısa alfa sarmaldan oluşur. MYND ZnF alanlarını içeren protein Transkripsiyonel yardımcı baskılayıcı protein BS69 içerir.

RING tipi ZnF motifleri; Gerçekten ilginç yeni gen olarak adlandırılan RING alanları iki çinko atomunu bağlayan ve proteininin KAP-1, PML ve birkaç protein ubiquitination yolunun son adımını katalizleyen E3 ubiquitin ligazını içerir

PHD tipi ZnF motifleri; PHD alanları, iki çinko atomunu koordine eder ve ilk bulundukları protein sınıfından (bitki homeodomain) adını alır. PHD ZnF alanlarını içeren protein, büyüme proteini 2'nin inhibitörü olarak bilinen Ing2, BPTF, Wnt sinyal yolu, WSTF transkripsiyon faktörü ve ölümle ilişkili transkripsiyon faktörü 1'i içerir.

TAZ tipi ZnF motifleri; transkripsiyonel adaptör çinko bağlama (TAZ) alanları, diğer ZnF'lere benzemeyen iki ZnF motifinden oluşur ve bu motifi içeren protein, CBP asetiltransferazı içerir

GATA tipi ZnF kalıpları; bu motifler, CX(2)-CX(17-20)-CX(2)-C dizilimi ve ardından gelen bazik bir bölge ile bir döngü oluşturur ve tip IV ZnF'ler olarak adlandırılır. Döngünün uzunluğuna göre alt gruplara ayrılabilirler: Tip IV 17 kalıntılı bir döngüye (CX2CX17CX2C) sahipken tip IVb 18 kalıntılı bir döngüye (CX2CX18CX2C) sahiptir. 19 veya 20 kalıntılı modiflerde mevcuttur ama nadir olarak bulunur ve esas mantarlar da tespit edilmiştir. GATA motiflerinin görevleri arasında; ökaryotlarda hücre büyümesinin gelişimi, farklılaşması ve bunların kontrolü vardır. GATA proteinleri, biri DNA'ya bağlanan diğer alan ise diğer faktörlerle bağlanarak DNA bağlanmasını düzenleyen birden fazla ZnF alanı içerir

GATAD1, N-terminalinde ZNF domain içeren ve 7q21–q22 kromozal alanda konumlanmış GATA tipi bir çinko parmak proteinidir. Ayrıca oküler gelişimle ilgili gen olarak da bilinir. Çalışmalar GATAD1'i yetişkin boyuyla ilişkilendirmiştir (Lomniczi ve ark 2015).

GATAD1'in transkripsiyonel baskılaması iki düzeyde gerçekleşir. Birincisi, ARC'de eksprese edilen ve GnRH sekresyonunun merkezi kabul edilen Kiss1 ve Tac3'ün doğrudan transkripsiyonel baskısını içerir. İkincisi ise, kromatin peyzajında, konfigürasyonu destekleyen bir gen aktivasyonundan gen susturulmasını destekleyen bir başkasına geçişe yol açmasıdır. GATAD1'in pubertal sürecin bir regülatörü olduğunun morfolojik kanıtı, sıçan ARC'nin kisspeptin nöronlarında tespit edilen GATAD1 transkriptleri olabilir (Lomniczi ve ark 2015).

1.1.6. Çinko Eksikliği

Çinko eksikliğinin nedeni çinko emilimini bozacak fitat bakımından zengin yüksek tahıl proteini alımı, malabsorpsiyon sendromu, karaciğer sirozunda ve orak hücre hastalığında görülebilen hiperzincüri, kanca kurdu enfeksiyonuna bağlı kan kaybı, vejetaryen diyetler veya kırmızı etten kaçınma olabilirken aynı zamanda iklim koşullarına bağlı olarak sıcak tropik iklimlerde aşırı terleme nedeniyle de oluşabilir (Prasad 2008). Çinko kaybı, esas olarak pankreas salgılarından bağırsakta meydana gelir ve 27-90 µmol/gün arasında değişebilir (King ve ark 2000) . Böbrek, filtrelenmiş çinkoyu yalnızca 8-11 µmol/gün tahmini kayıplarla yeniden emdiği için idrar kayıpları nispeten daha düşüktür. Çinko ayrıca epitel hücrelerinin dökülmesi, ter, meni, saç ve menstrüasyon yoluyla da kaybedilir (Russell ve ark 2001).

Çinkonun yapısal, katalitik ve düzenleyici fonksiyonları göz önüne alındığında, bu elementin eksikliği, deri, mide-bağırsak, merkezi sinir sistemi, bağışıklık, iskelet ve üreme sistemleri dahil olmak üzere birçok organ sistemini etkilemektedir. Ayrıca düşük vücut ağırlığı ve iştah deregülasyonu ile çinko eksiliği koreledir (Prasad ve Kucuk 2002). Çinko eksikliği sırasında gelişen geniş yelpazeli klinik semptomlar, çinkonun vücudumuzda çeşitli biyolojik süreçlerde rol aldığının kanıtıdır (Tuerk ve Fazel 2009). Prasad'a göre, dünyada yaklaşık iki milyar insan düşük çinko seviyelerinden dolayı büyüme geriliği yaşamaktadır. Ayrıca, retina-koroid kompleksinin, çeşitli tekniklerle ölçümü sonucunda insanlar da dahil olmak üzere farklı türlerde gözdeki en yüksek çinko konsantrasyonunu içerdiği görülmüştür. Çinko eksikliği ise, karanlık adaptasyonunun bozulmasına, fotopik, skotopik yanıtların azalmasına neden olur (Ugarte ve ark 2013).

1.1.7. Maternal Çinkonun Önemi

Bu insanlar için önemli eser elementin, hamilelik ve erken doğum sonrası kritik gelişim dönemlerindeki eksikliği, yavruların uzun vadede sağlığını olumsuz yönde etkileyebilir, aynı zamanda birkaç nesil ilerisinde de devam edebilen kronik hastalık geliştirme riskini artırabilir (Maret ve Sandstead 2008). İnsanlar için deneysel hayvan çalışmaları ve gözlemsel çalışmaların sonuçlarına bakılarak gebelik sürecinde maternal çinko eksikliğinin infertilite, doğum kusurları, fetal büyüme geriliği, uzun süreli doğum, embriyonik veya fetal ölüm ve bağışıklık fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği öngörülmüştür (Hess ve King 2009). Bunlara ek

olarak bu elementin eksikliği nörolojik komplikasyonlara, maternal metabolizmasında diyabet kaynaklı değişikliklere ve yetişkinliğe kadar devam edebilecek hipertansiyon ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi kronik hastalık risklerinin artmasına yol açar (Tomat ve ark 2008).

Türk ve arkadaşları çinko eksik diyetle beslenen tavukların civcivlerinin doğumdan kısa bir süre sonra öldüğünü ve sonrasında çinko eksikliği olan civcivlerde de çoklu yapısal anormallikler tespit edildiğini bildirmişlerdir (Turk ve ark 1959, Kienholz ve ark 1961). Memeliler için çinko eksikliği teratojenik olabilir bunun kanıtı da 1966 yılında Hurley ve Swenerton tarafından bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada, ciddi derecede çinko eksikliği olan diyetle (<1µ; g çinko/g) beslenen sıçanların kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda canlı fetusa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Hayatta kalan fetuslar için de düşük vücut ağırlıkları ve çoklu iskelet ve yumuşak doku anormalliklerine sahip olduklarını belirtmişlerdir (Hurley ve Swenert'on 1966). 1960'ların ortalarından bu zamana kadar, hamilelik sürecinde ciddi çinko eksikliğinin teratojenik etkileri, sıçanlar, fareler, domuzlar, koyunlar ve rhesus maymunları gibi birçok türde gösterilmiştir (Rogers ve ark 1985). Rogers ve arkadaşları teratoloji raporunda bütün implantasyon yerlerinin %90'ının sıçanın şiddetli maternal çinko eksikliğinden olumsuz yönde etkilendiğini ve neredeyse her organ sisteminin etkilenebileceğini düşünmektedir (Rogers ve ark 1985).

1.2. Ergenlik

Webster'ın sözlüğüne bakılacak olursa ergenlik dediğimiz olgu ilk üreme yeteneğine sahip olma ve genital organların olgunlaşması, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi, doğrusal büyüme hızında hızlanma, duygulanımda değişiklikler ve kadınlarda görülen menarş oluşumu ile tanımlanır. İnsan fizyolojisinin yanı sıra psiko-sosyal ve psiko-davranışsal özelliklerin bu değişim döneminde hormonal mekanizmalar tarafından düzenlendiği gösterilmiştir.

Fizyoloji düzeyinde, ergenlik yeni bir organizma süreci olarak düşünülmemeli, bundan ziyade fetal yaşamda zaten geliştirilmiş bir ağın yeniden uyarılması ve işlev görmesi olarak düşünülmelidir.

1.2.1. Ergenliğin Başlangıcı

Ergenlik başlangıcının temeli, ön hipofizden LH ve FSH'ın pulsatil sekresyonuna yol açan GnRH'nin hipotalamik pulsatil salgılanmasıdır. Bu iki gonadotropin, ikincil cinsel özellik gelişimi, gonadal büyümeyi, steroidogenezi ve gametogenezi uyarır. Kadın ve erkekte ilk pubertal özellikler, meme gelişimi ve testis büyümesi, normalde kızlarda 8 ila 13 yıl arasında ve erkeklerde 9 ila 14 yıl arasında gerçekleşir. Ergenlik zamanlaması genel popülasyonda büyük farklılıklar gösterir ve hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenirken (Parent ve ark 2003, Gajdos ve ark 2008) genel olarak genetik faktörlerin rol oynadığı bazı çalışmalarla desteklenmiştir. Monozigotik ikizlerin korelasyon çalışmalarından elde edilen gözlemler (Zacharias ve Wurtman 1969, Fischbein 1977) pubertal zamanlamadaki varyansın %70-80'inin genetik faktörlerle açıklanabileceğini göstermiştir. Kaprio ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonucunda farklılıkların %74'ünün genetik faktörlerden ve %26'sının çevresel faktörlerden kaynaklandığını bildirdi (Kaprio ve ark 1995). Bir derleme makalesinde, Palmert ve Boepplepubertal zamanlamadaki farklılıkların genetik açıdan poligenik özellikte olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Palmert ve Boepple 2001). Aynı aile ve ırk gruplarında, dizigotik ikizlerin tersine monozigotik ikizler arasında görülen ergenlik başlangıcının yüksek korelasyonu, yine pubertal başlangıcın genetik düzenlenmesi için bir kanıt oluşturabilir. Bu veriler de pubertal başlangıçtaki farklılıkların %50-80'inin genetik faktörler tarafından belirlendiğini göstermektedir (Towne ve ark 2005, van den Berg ve Boomsma 2007).

1.2.2. Ergenliğin Fizyolojisi

Kiss1 geni, peptidi ve reseptörü

Kiss1 geni, kisspeptinleri kodlayan gendir ve 1996 yılında insan malign melanomunda metastazın bir baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Lee ve ark 1996). Hershey'de (PA, ABD) keşfedildikten sonra bu gen kasabada üretilen ünlü çikolata 'Kisses' adıyla anılmıştır.

Kiss1 geni kromozom 1q32'de lokalize edilmiştir ve ilk ikisi çevrilmeyen dört eksona sahiptir (West ve ark 1998). Kiss1'in ilk transkripti 145 aminoasite sahiptir. Proteolitik olarak en yaygın formu olan 54 aminoasite ve diğer formları olan

14, 13 ve 10 aminoasit içeren peptitlerine ayrılır. Translasyon sonrası proteoliz 66-67 ve 123-124 pozisyonlarında pre-pro-kisspeptin (145 aminoasit) içinde iki dibazik kalıntıda meydana gelir (de Roux 2006). 54 aminoasit ve daha kısa peptidler, Arg-Phe-NH2'nin C-terminal sekansını paylaşan peptidlerin RF amid grubuna aittir ve artık topluca kisspeptin olarak adlandırılır (Kotani ve ark 2001). Metastaz önleyici özelliklerinden dolayı 54 aminoasit transkripti 'metastin' olarak adlandırılmıştır (Ohtaki ve ark 2001).

Şimdilerde Kiss1r olarak adlandırılan kisspeptin reseptörü, ilk olarak 2001 yılında sıçan beyninde GPR-54 (G protein bağlı reseptör-54) için bir ligand olarak adlandırılmıştır (Gottsch ve ark 2009). Kiss1r yedi hidrofobik trans-membran alanları ile 398 aminoasit proteini kodlayan beş ekson içerir ve kromozom 19p13.3 alanına lokalize olmuştur (Muir ve ark 2001). Galanin veya galanin benzeri peptit bağlamasa da galanin reseptör ailesininkine yakın bir aminoasit sekansına (%40 özdeşlik) sahiptir (Lee ve ark 1999). GPR-54, hipotalamus, preoptik alan (POA), hipokampüs, orta beyin, amigdala, limbik sistem, bazal gangliyonlar gibi beyin bölgelerinde eksprese edilirken (Lee ve ark 1999, Smith ve ark 2006) plasenta, hipofiz, pankreas, kalp, kas, böbrek, karaciğer, akciğer, timüs, bağırsak ve testis gibi periferik dokularda da ekspre edilir (Messager ve ark 2005). Kiss1r kisspeptin ile bağlandıktan sonra, fosfolipaz C'yi, ikincil hücre içi habercilerini, bunun sonucunda da inositol trifosfat ve diasilgliserolü aktive eder, bunlar da kalsiyum salgılanmasına ve kisspeptinin fonksiyonuna aracılık eder (Muir ve ark 2001, Constantin ve ark 2009). Kiss1r'in aktivasyonu hücre içi kalsiyumda bifazik bir artış ile sonuçlanır. Hızlı bir artış ve bunu daha uzun süreli ikinci bir aşama takip eder (Min ve ark 2014). Bu ikinci fazı korumak ve bu nedenle sinyalleşmeyi sürdürmek için kisspeptin reseptörlerinin hücre içine hareketi önemlidir. Hücre havuzuna olan bu hareket, geri kullanım ve depo için gereklidir (Min ve ark 2014). Reseptör hareketi olmadan, kisspeptin reseptörü, başlangıçtaki akut fazdan sonra duyarsızlaşmaya maruz kalır (Min ve ark 2014).

İnsanlarda, kisspeptinin plasenta içindeki hücre popülasyonlarında ve daha sonra testislerde, yumurtalıklarda, pankreasta ve ince bağırsakta eksprese edildiği bulunmuştur (Kotani ve ark 2001, Muir ve ark 2001). Beyinde de kisspeptin keşfedilmiş ve haritalanmıştır. Kemirgenlerde hipotalamusta, özellikle ağırlıklı

olarak arkuat nükleusta ve anteroventral periventriküler çekirdekte (AVPV) bulunmuştur (Gottsch ve ark 2004). Ayrıca bu bölgeler toplu olarak üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesi (RP3V) olarak anılmaktadır (de Croft ve ark 2012). İnsanlarda ise infindibular çekirdekte ve POA'da bulunmuştur ki bunlar sırasıyla kemirgenlerdeki ARC ve RP3V ile benzerdir (Rometo ve ark 2007).

GnRH nöronları Kiss1r eksprese eder ve bu bulgular, kisspeptinin GnRH'nin nörosekresyonunda doğrudan tutulmasını göstermektedir (Han ve ark 2005, Messager ve ark 2005). Kisspeptin ve GnRH aksonları arasında akso-somatik, akso-dendritik ve akso-aksonal sonlanmalar gösterilmiştir (Clarkson ve Herbison 2006, Ramaswamy ve ark 2008, Smith ve ark 2008, Hrabovszky ve ark 2010, Uenoyama ve ark 2011). Bununla birlikte, insanlarda ve bugüne kadar incelenen diğer türlerde, tüm GnRH nöronları kisspeptin nöron temasları almadığı ve bu temasların insidansının düşük olduğu görülmüştür (Clarkson ve Herbison 2006, Ramaswamy ve ark 2008, Smith ve ark 2008, Hrabovszky ve ark 2010).

Kisspeptin ve GnRH sekresyonu

Kisspeptin hem hayvan modellerinde hem de insanlarda HPG ekseninin güçlü bir uyarıcısıdır. Kisspeptin, GnRH'yi portal dolaşımda serbest bırakmak için kisspeptin reseptörüne bağlanarak doğrudan GnRH nöronlarını uyarır bu da LH ve FSH'ın ön hipofiz gonadotroplarından salgılanmasını uyarır. GnRH periferik dolaşımda ölçülemediğinden, her GnRH salınımı ile bir LH salınımı ilişkili olduğundan, LH salınım frekansı yaygın olarak ölçüm için kullanılır (Clarke ve Cummins 1985).

Kisspeptinin uyarıcı işlevini, hipotalamik GnRH sistemi üzerinde doğrudan bir etki yoluyla gonadotropin salgılanmasına uyguladığına dair kanıtlar, hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular ile sağlanmaktadır. Kisspeptin, in vitro olarak GnRH nöronlarının depolarizasyonuna neden olur ve ateşleme oranını arttırır (Han ve ark 2005, Zhang ve ark 2008). Koyunlarda, intraserebroventriküler kisspeptin infüzyonu beyin omurilik sıvısı GnRH içeriğinde ve aynı anda serum LH ve FSH'de dramatik bir artışa neden olmuştur (Messager ve ark 2005).

“KNDy Hipotezi” ve GnRH sekresyonu düzenlenmesi

Hipotalamustaki kisspeptin, nörokinin B (NKB) ve dinorfin sık kolokalizasyon gösterir. Kisspeptin ve nörokinin B nöronlarının haritalanması, menopoz sonrası kadınların infundibular çekirdeğinde benzerlik göstermiş ve insan infundibular çekirdeğinde nörokinin B ve dinorfini eksprese eden bir kisspeptin nöronlarının alt popülasyonunun tanımlanmasını sağlamıştır (Rometo ve ark 2007, Hrabovszky ve ark 2010). Kisspeptin, nörokinin B ve dinorfini ifade eden bu eşsiz bölge türler arasında korunur ve koyun, kemirgenlerdeki hipotalamusun arkuat nükleusunda bulunur (Burke ve ark 2006, Goodman ve ark 2007, Navarro ve ark 2009). Bununla birlikte, nörokinin B ve dinorfin, preoptik alandaki ve RP3V'deki kisspeptin popülasyonunda yoktur. Üç nöropeptidi de birlikte eksprese eden bu infundibular (insanlarda) ve arkuat nükleus (kemirgen ve geviş getirenlerde) alanlarındaki nöronlar KNDy nöronları olarak adlandırılır (Cheng ve ark 2010).

KNDy nöronlarının GnRH sekresyonu sürecinin kritik bir bileşenini oluşturduğu hipotezi, GnRH/LH salınımının, kisspeptin ve NKB'nin uyarıcı ve dinorfinin inhibitör olması ve bu üç nöropeptidin renklendirilmesine dayanıyordu. Kısacası, “KNDy hipotezi”, NKB'nin KNDy nöronları arasında aktivasyonu tetikleyerek nabız başlangıcından sorumlu sinyal olduğunu, kisspeptin'in KNDy nöronlarından GnRH salgılanmasını sağlayan sinyal olarak görev yaptığını ve dinorfinin her nabzı sonlandıran sinyal olarak hizmet ettiğini anlatan bir hipotezdir. Bu hipotez; KNDy peptitleri içeren aksonların, KNDy hücre gövdelerinin çoğu ile doğrudan sinaptik temas halinde olduklarını ve bu temasların belki de GnRH'nin pulsatil salınımını koordine etmek için senkronize ateşleme patlamaları ürettiklerini belirtmektedir. Ayrıca kisspeptin ve NKB reseptörlerinin anatomik olarak sırasıyla GnRH ve KDNy nöronlarından sekrete edildiğini göstermektedir. Bu öngörülen bilgilerle tutarlı olacak şekilde; kisspeptin, NKB ve dinorfinin postsinaptik reseptörlerinin farmakolojik manipulasyonları (sırasıyla, GRP-54, NK3R (nörokinin 3 reseptörü) ve KOR (K-opioid reseptörü)) pulsatil GnRH salınımını değiştirdiği belirtilmiştir (Wakabayashi ve ark 2010, Kinsey-Jones ve ark 2012, Goodman ve ark 2013, Yamamura ve ark 2014).

KNDy nöronları arasındaki karşılıklı bağlantıların varlığı, popülasyonun GnRH'nin pulsatil salınımını üretmek ve koordine etmek için senkronize ateşleme

üretebileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezi desteklemek için KNDy nöronları, KNDy peptitleri için uygun postsinaptik reseptörleri eksprese etmelidir. Tahmin edildiği gibi, çok-etiketli immünofloresan çalışmaları, fare, sıçan ve koyunların KNDy nöronlarının çoğunda NK3R ekspresyonunu doğrulamıştır (Burke ve ark 2006, Navarro ve ark 2009).

Dinorfin için en yüksek afiniteye sahip reseptör KOR, kadın ve erkek farede KNDy nöronlarının sadece %20 ve %6'sında yerinde hibridizasyon ile tespit edilmiştir (Navarro ve ark 2009). Navarro ve arkadaşlarının önerdiği gibi, bu beklenmedik şekilde düşük renklendirme, düşük mRNA seviyeleri için yerinde hibridizasyonun yetersiz duyarlılığından kaynaklanabilir. Bu, erkek farelerde KNDy nöronlarının %41'inde KOR saptayan RT-PCR (gerçek zamanlı bir PCR) analizi ile desteklenmiştir (Ruka ve ark 2013). Buna karşılık, koyunlarda yapılan yeni bir immünofloresan çalışması, KNDy nöronlarının %90'ından fazlasında KOR bildirmiştir (Weems ve ark 2016). KOR kolokalizasyonundaki tür farkı, dinorfinin kemirgende nabız üretiminde keçi ve koyunlara göre farklı fonksiyonel roller oynayabileceğini öne süren farmakolojik verilerle tutarlıdır. İlginç bir şekilde, fare beyin dilimlerinde kaydedilen KNDy nöronlarının çoğu, KOR agonistleri tarafından taklit edilen bir etki olan dinorfinin banyo uygulamasını takiben ateşleme aktivitesini azaltmıştır (de Croft ve ark 2013, Ruka ve ark 2013). Bu, KNDy nöronlarının KOR eksprese ettiği kemirgenlerde daha önce bildirilenden daha yüksek bir yüzdeyi gösterebilmesine rağmen, dinorfinin KNDy nöron aktivitesi üzerinde dolaylı bir etkisi de mümkündür. Bu nedenle, kemirgen beyninde GnRH nabız salımını değiştirmek için doğrudan KNDy nöronları üzerindeki dinorfin etkisinin rolü henüz net değildir. Ayrıca koyun ARC'sinde bir dizi KNDy olmayan nöronun KOR eksprese ettiği ve bu nedenle bu nöronlar için epizodik GnRH salınımı üzerindeki dinorfinin etkilerindeki bir rolün göz ardı edilemeyeceğine dikkat edilmelidir (Weems ve ark 2016).

Kisspeptin reseptörü GPR-54, primat beyin ARC'sinde in situ hibridizasyon kullanılarak saptandı, yükselen LH düzeylerine uygun olarak jüvenil ve ergenlik ortası dönem arasında ekspresyon seviyeleri arttı (Shahab ve ark 2005). Transgenik bir LacZ knockin fare modeli ARC'de GPR-54 için kanıt bulunamamasına rağmen (Herbison ve ark 2010), bu reseptör için mRNA, koyun ve farelerin ARC'sinde in

situ hibridizasyonla tespit edilmiştir (Lee ve ark 1999, Fu ve van den Pol 2010, Smith ve ark 2011). Ancak koyun ve sıçanlarda ikili yerinde hibridizasyon ve immünohistokimya deneyleri GPR-54'ün KNDy nöronları içinde lokalize olmadığını gösterir ve bunun yerine bu reseptörlerin ARC pro-opiomelanokortin (POMC) ve tuberoinfundibular dopamin nöronları içinde eksprese edildiğini gösterir (Higo ve ark 2017). Ayrıca, kisspeptin, fare beyin dilimlerinde (de Croft ve ark 2013) ARC kisspeptin nöron elektriksel aktivitesi üzerinde bir etkiye sahip değildir, bu da NKB ve dinorfinin aksine, kisspeptinin muhtemelen pulsatil sekresyonunu modüle etmek için doğrudan KNDy nöronları üzerinde etkili olmadığını gösterir. Kisspeptin'in KNDy nöronları üzerindeki doğrudan eylemleri için bu kanıt eksikliği, GnRH nöronlarındaki GPR-54 ekspresyonunun farelerde doğurganlık için yeterli olduğu verileri ile uyumludur (Kirilov ve ark 2013). Bununla birlikte, GPR-54 nakavt farelerinden toplanan fare beyin dilimleri içinde kavisli nöronların kisspeptin aktivasyonu kaydedilmiştir (Liu ve Herbison 2015), kisspeptin'in, ARC'deki diğer postsinaptik reseptörler yoluyla hareket edebileceğini gösterir. Bu reseptörlerin nabız üretiminde rolü daha az açıktır ve bunun yerine üreme dışı işlevlerde rol oynayan nöronların alt popülasyonlarını yansıtabilir.

KNDy nöronları içinde GPR-54 ekspresyonu için güçlü kanıt eksikliği, kisspeptin'in nabız oluşumunu kontrol etmek için karşılıklı bağlantılar yoluyla hareket etmediğini göstermektedir. Daha muhtemel olarak, kisspeptin, doğrudan GnRH nöron aktivitesini yönlendirmek için uyarıcı bir çıktı görevi görür. Koyunlarda, preoptik GnRH nöronlarının %78 ila %86'sı GPR-54 (Smith ve ark 2011) içerir. Farede GnRH nöronlarının yaklaşık %80'i GPR-54'ü ifade eder (Herbison ve ark 2010) ve fare beyin dilimlerinde kisspeptine yanıt verir (Kirilov ve ark 2013). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ARC kisspeptin nöron aktivitesinin optogenetik teknikler kullanılarak geçici olarak inhibisyonu, LH nabız frekansını ve genliğini azaltmıştır (Clarkson ve ark 2017). NK3R'nin, koyun (Amstalden ve ark 2010) ve kemirgen beyinlerinde (Lucas ve ark 1992, Krajewski ve ark 2005) GnRH hücre gövdeleri tarafından eksprese edilmediği belirtilse de NK3R proteininin sıçanda GnRH nöron akson terminallerinde lokalize olduğu rapor edilmiştir (Krajewski ve ark 2005). İkinci bulguyu desteklemek için, NK3R'nin GnRH sinir terminallerinde aktivasyonu, kisspeptin'den bağımsız bir etkiyle GnRH salınımını indükler (Gaskins ve ark 2013). Bununla birlikte, GnRH nöron soması fare beyin

dilimlerinde (Gaskins ve ark 2013) NKB'ye yanıt vermez. NKB, kisspeptin'in GPR54 sinyallemesi yoluyla GnRH nöronlarında LH salınımının uyarıcı bir itici güç olarak hareket eder.

KNDy nöron aktivitesinin inhibisyonuna ek olarak, dinorfin ayrıca GnRH nöronlarını doğrudan inhibe edebilir. Koyunlardaki ARC dinorfin nöronlarının progesteron negatif geri beslemesine aracılık ettiğine dair önemli kanıtlar vardır (Goodman ve ark 2004) ve POA GnRH nöronlarının yaklaşık %40'ı ve koyunlardaki mediobasalhipotalamus (MBH) GnRH nöronlarının yaklaşık %90'ı dinorfin liflerinden sinaptik temas alır (Goodman ve ark 2004). Önceki çalışmalar kemirgen beynindeki GnRH nöronlarında KOR mRNA kolokalizasyonuna dair kanıt bulamamasına rağmen (Mitchell ve ark 1997, Sannella ve Petersen 1997), yakın tarihli bir çalışmada hem sıçan hem de koyun beynindeki GnRH nöronlarının büyük çoğunluğunda KOR immünoreaktivitesi tespit edildi (Weems ve ark 2016). Bu nedenle, dinorfinin nörosalgılayıcı aktiviteyi inhibe etmek ve bir GnRH nabzını etkili bir şekilde sonlandırmak için hem KNDy ağı içinde hem de GnRH nöronlarında hareket etmesi mümkündür.

Sonuç olarak, kisspeptin ve dinorfinin, GnRH nöronlarının aktivitesini modüle etme yeteneği ve bu hücrelerdeki uygun reseptörlerin ekspresyonu için kanıtlar, GnRH nöronlarına fonksiyonel projeksiyonları destekler.

GnRH nöronlarının keşfinden ve karakterizasyonundan bu yana, steroid hormon geri bildirim mekanizmasının bu nöronlarla olan ilişkisinin araştırılması öncelik taşımaktaydı çünkü yapılan çalışmalarda GnRH nöronlarının steroid hormon reseptörlerinden özellikle östrojenin geri bildirim mekanizması için önemi bilinen östrojen reseptör α'dan yoksun olduğu bulunmuştur (Herbison ve Theodosis 1992).

Kisspeptin ve gonadotropin inhibitör hormonu nöronları GnRH salgılanmasının düzenleyicileridir, bunlardan ilki seks steroid geri beslemesinin iletilmesi için büyük bir kanaldır. Mevsimsel koşullar, stres, bağışıklık durumu, beslenme durumu vb. bilgiler GnRH hücreleri üzerinde birleşen nöronal yolları oluşturur. Kisspeptin gibi, gonadotropin inhibitör hormonu bir RF-amid peptididir ve en azından bazı türlerde gonadotroplar üzerinde olumsuz etkiler yapar (Yamamura ve ark 2014). Gonadotropin inhibitör hormonunun memelilerde oynadığı rol

hakkında son zamanlarda ve kapsamlı incelemeler de mevcuttur (McDevitt ve ark 2008, Lehman ve ark 2010, Navarro ve ark 2015).

GnRH hücrelerinin seks steroidleri ile modülasyonunda hiçbir tek nöronal sistemin baskın bir rol alamayacağı dikkate değerdir. Beyin sapının noradrenerjik hücreleri normal fonksiyon için önemli görünmektedir, glutamaterjik girdinin GnRH hücrelerinin pozitif regülatörü olarak önemli bir rol oynaması muhtemeldir (Grachev ve ark 2012). Hipotalamustaki diğer en yaygın nörotransmitter GABA ve GABAerjik hücrelerin GnRH hücrelerinin majör negatif düzenleyicileri olduğu görülmektedir (Clarkson ve ark 2017).

Farklı laboratuvarlarda hem sıçanlarda hem de farelerde, kisspeptin hücrelerinin sıçan ve fare beynindeki AVPV ve PeV'de preovulatuar dönemde yukarı regüle edildiği, ancak arkuat nükleustaki kisspeptin hücrelerinin aşağı regülasyonu gösterilmiştir (Whisnant ve Goodman 1988). Bu nedenle, AVPV/PeV kisspeptin hücreleri, bu türlerde GnRH ve LH'deki preovulatuar dalgalanmayı ortaya çıkaran pozitif geri bildirimin temel mekanizması kabul edilir.

Kisspeptin hücrelerinin ovariektomi sonrası yukarı regülasyonu gösterildiği gibi negatif geri beslemeye de aracılık ettiği görülmektedir (Weems ve ark 2016). Ayrıca, sadece östrojenle yapılan kronik tedavi, ovariektomi uygulanan koyunların ARC'sindeki kisspeptin hücrelerinde fos miktarını azaltır (Cholanian ve ark 2014). ARC'deki hemen hemen tüm kisspeptin hücreleri dinorfin ve NKB 'yi ifade eder (Higo ve ark 2017). KNDy hücreleri ayrıca yüksek düzeyde ERα ve progesteron reseptörünü eksprese eder (Herbison ve ark 2010). Dinorfinin, progesteronun negatif geri besleme etkisine aracılık etmede rol oynadığına dair iyi kanıtlar vardır (Smith ve ark 2011). Ayrıca kronik östrojen tedavisinin ovariektomi koyunlarında KNDy hücrelerini aşağı doğru düzenlediğine dair kanıtlar mevcuttur (Cholanian ve ark 2014). Bu hücrelerin negatif geri bildirim etkisini GnRH hücrelerine aktardığı fikri östrojen döngüsünün luteal fazında ARC'deki kisspeptin ekspresyonunun azaldığı gözlemiyle desteklenebilir (Cholanian ve ark 2014).

1.2.3. Ergenliğin Metabolik Kontrolü

Memeliler, ergenlik döneminde cinsiyet hormonları ve büyüme hormonu sebebiyle çeşitli fiziksel ve psikolojik değişikliklere maruz kalır. Büyüme hızında

artış ve nesil devamı için üreme ve cinsel olgunluğa erişmek, yaşamın bu evresinde karşılaşılan önemli değişikliklerdendir (Martos-Moreno ve ark 2010). Hem büyüme hem de üreme yüksek düzeyde enerji gerektirdiğinden buna uygun enerji depoları da gerektirir. Sindirim sisteminde enerji alımından ve yağ dokusunda enerji depolamasından sorumlu peptitlerin merkezi sinir sistemine vücudun o anki metabolik durumu hakkında nasıl bilgi sağladığı bilgisi son zamanlarda yapılan çalışmalarla önemli ölçüde artmıştır (Martos-Moreno ve ark 2010). Bunların ışığında, memelilerin özellikle prepubertal dönemde beslenme durumunun pubertal gelişim üzerinde önemli bir etkisi olduğu ve ergenlik zamanlamasındaki çeşitliliğin %25'ini açıkladığı söylenebilir (Soliman ve ark 2014).

GnRH salgılanmasını kontrol eden sinir ağlarını etkileyen birçok faktör arasında, metabolik yakıt ve enerji depolarının durumu hakkındaki bilgiler de yer alır. Bu bilgiler, pubertal başlangıç ve ilerlemenin kontrolündeki temel taşlardan biridir. 1960'ların başından beri öne sürülen bu kavram (Kennedy ve Mitra 1963) daha sonra hayvan modellerinden ve insanlarda beslenme durumlarıyla ilişkili olarak ergenlik zamanlamasının epidemiyolojik çalışmalarından elde edilen verilerle desteklenmiştir. Metabolik kontrolün bu mekanizmaları dinamiktir ve HPG ekseninin uzun süreli veya yoğun enerji mevcudiyetinin azaldığı durumlarda inhibisyonu ile sonuçlanır, bunun tersi enerji elde edildiğinde meydana gelir. Bununla birlikte, metabolizma ve üremenin ortak düzenleyici yollarını gösteren deneysel ve epidemiyolojik kanıtlara rağmen, üreme ve enerji dengesinin koordineli kontrolünden sorumlu kesin nöroendokrin sistemler ve peptitler hala sadece kısmen bilinmektedir (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1. İştah regülasyonunda görev alan peptitler (Robert M. Berne 2008).

Uyaran	İnhibe eden
Nöropeptid Y (NPY)	Leptin
Agouti-ilişkili peptid (AgRP)	İnsülin
Melanin deriştirici hormon (MCH)	α-Melanosit uyarıcı hormon (α-MSH)
Oreksin A ve B (hipokretin 1 ve 2)	Kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH)
Galanin	Ürokortin
Noradenalin	Kokain-amfetamin düzenleyici
Ghrelin	transkript (CART)
Kortizol	Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1)
	Kolesistokinin (CCK)
	İnterlökin-1β
	Serotonin
	Enterostatin
	Kalsitonin
	Bombesin

Leptin

Kemirgen ob (obez) ile homolog olan insan LEP geninin (7q31.3) 16 kDa ürünü olan Leptin, enerji homeostazının kontrolünde en önemli adipokinlerden biridir. Diğer birçok doku da bu peptidi üretebilmesine rağmen, esas olarak trigliserit içeriği ile doğrudan ilişkili subkutan diferansiye adipositler tarafından üretilir (Meier ve Gressner 2004). Dolaşımdaki leptin düzeylerinin yetişkinlerde (Maffei ve ark 1995), çocuklarda ve ergenlerde (Argente ve ark 1997) yetersiz beslenme sonrası konsantrasyonlarındaki azalma devamında takviye gıdayla normal seviyesine geri dönmesiyle vücut yağ içeriği ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kolaczynski ve ark 1996). Bu nedenle, leptin, doğrudan vücudun yağlanma sinyali olarak kabul edilir (Woods ve D'Alessio 2008).

Leptin, pubertal gelişim boyunca erkeklerde ve kadınlarda günlük varyasyon ile dolaşıma pulsatil olarak salgılanır (Ankarberg-Lindgren ve ark 2001). Leptin reseptörleri, sınıf I sitokin reseptör ailesine aittir ve bugüne kadar tanımlanmış en az altı farklı alternatif izoformu (OB-Ra, Rb, Rc, Rd, Re ve Rf) farelerde, dört izoformu ise (LEP-R5, R15, R67, R274) insanlarda tanımlanmıştır (Koerner ve ark 2005). Rb/R274 en uzun izoformdur ve hücre içi sinyal alanı içerir. Bu izoformun en yüksek

konsantrasyonları hipotalamusta bulunur ve esas olarak JAK (Janus kinaz)/STAT (sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü) aktivasyonuyla leptinin merkezi etkilerini oluşturur. Daha kısa izoformları kan dolaşımındaki toplam ve serbest leptin miktarını leptini bağlayarak modüle eder (Kratzsch ve ark 2002).

Leptin, kan-beyin bariyerini leptin reseptörlerini kullanarak bir transport mekanizmasıyla geçer ve beyin omurilik sıvısına ulaşır. Leptin reseptörleri arkuat ve paraventriküler çekirdeklerde fazla tespit edilmiştir (Sone ve Osamura 2001). Leptin esas olarak arkuat nükleusta CART (kokain-amfetamin düzenleyici transkript) ve POMC üreten nöronların aktivasyonu, nöropeptit Y ve AgRP (agouti proteinle ilişkili peptit) üreten nöronların inhibisyonuyla enerji dengesine aracılık eder (Ahima 2005).

Leptin ve pubertal gelişim

Leptinin üreme sistemindeki rolü, leptin eksikliği olan farelerin infertilitesini leptin tedavisi ile aşılabileceğiyle gösterilmiştir (Chehab ve ark 1996). Benzer şekilde, hipogonadotropik hipogonadizm tanısı alan homozigot gen mutasyonları nedeniyle leptin eksikliği olan insanlarda uzun süreli rekombinant leptin tedavisiyle pulsatil noktürnal gonadotropin sekresyonu gözlenmiştir (Farooqi ve ark 1999). Ek olarak, leptin reseptör eksikliği olan insanlar, dereceleri farklı olarak hipogonadotropik hipogonadizm gösterir (Farooqi ve ark 2007).

Leptinin cinsel olgunlaşmanın başlamasında bir etkisinin olup olmadığı veya ergenlik başlangıcı için kritik bir leptin seviyesinin bir koşul olup olmadığı konusunda çok fazla tartışma yapılmıştır. Bunun için yapılan bir çalışmada, erken ergenlik döneminde farelere küçük dozlarda leptin verilmesinin cinsel olgunlaşmayı ilerletmesi, ancak bu etkinin prepubertal hayvanlarda elde edilememesi, leptinin pubertal gelişim için önemini destekler niteliktedir (Gueorguiev ve ark 2001).

Serum leptin seviyelerinde cinsel bir dimorfizm vardır. Erkeklerde leptin seviyeleri Tanner evreleri II ila III'e kadar artar ve ergenlik ilerledikçe azalır. Aksine, serum leptin düzeyleri ergenlik döneminde kadınlarda sürekli ve ilerleyici bir artış göstermektedir. Yine, leptin düzeyleri ile vücut yağ kütlesi arasındaki bu korelasyon kadınlarda daha belirgindir (Ahmed ve ark 1999).

Ergenlik boyunca leptin bağlanma aktivitesinde bir düşüş gözlemlenmiştir ve bunun nedeni, çözünür reseptörünün serum seviyelerindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (Quinton ve ark 1999). Ergenlik döneminin başlangıcında, dişiler erkeklerden çok daha yüksek serbest leptin indeksine sahiptir (Martos-Moreno ve ark 2006).

Leptin tarafından GnRH üretiminin doğrudan uyarıldığı bunun yanısıra, leptinin HPG ekseni üzerinde ara devrelerin ve sinyallerin yaygın olduğu söylenebilir. Gerçekten de leptinin GnRH salgılanması üzerindeki etkisi, kısmen, kisspeptin üreten nöronlar yoluyla olabilir (Smith ve ark 2006) çünkü bu nöronlar leptin reseptörlerini eksprese ettiği bilinmektedir. Leptine yanıt olarak GnRH salgılanmasının dozunun amplitüde değil hızla bağlı olduğu gösterilmiştir (Lebrethon ve ark 2000). Ön hipofizde eksprese edilen leptin ve reseptörü (Jin ve ark 1999), LH ve FSH salınımını nitrik oksit sentaz aktivasyonuyla doğrudan uyarır (Yu ve ark 1997).

Leptin'in bu eksen üzerindeki etkisi için dolaylı bir mekanizma da varsayılmıştır. Leptin, arkuat nükleustaki NPY ekspresyonunu azaltır ve bu da NPY'nin pulsatil GnRH salınımı üzerindeki inhibitör etkisini azaltır (Plant ve Shahab 2002).

Leptin ayrıca gonadlar üzerinde doğrudan etkilere sahiptir. Yetişkin sıçan testisinde, leptin reseptörü hem Leydig hem de Sertoli hücrelerinde (Tena-Sempere ve ark 2001) eksprese edilir, spesifik Ob-Rb izoformu ergenlik döneminde yetişkinliğe kıyasla daha yüksek seviyelerde ifade edilir (Tena-Sempere ve ark 2001). Leptinin testis seviyesinde testosteron sekresyonunu inhibe etmesi ve pubertal başlangıcından sonra bu organda Ob-Rb'nin aşağı regülasyonu, testosteron sekresyonundaki artışa izin verebilir.

Nöropeptit Y (NPY)

36-aminoasitli bir peptit olan NPY, memelilerde en güçlü oreksijenik ajanlardan biridir. Yapısal olarak benzer peptit YY (PYY) ve pankreatik polipeptit ile birlikte NPY ailesini oluşturur. NPY, merkezi ve periferik sinir sistemlerinde bol miktarda dağılır. Merkezi sinir sisteminde hipotalamus, serebral korteks ve beyin sapı (Baraban 1998, Lin ve ark 2005) gibi bölgelerde bulunurken en yüksek oranda

arkuat nükleusta ifade edilir (Lin ve ark 2004). NPY, adrenal bezlerde de yüksek oranda eksprese edilir (Schütz ve ark 1998). Periferde NPY beyaz yağ dokusunda, kemik hücrelerinde ve sempatik sinir sisteminde bulunmuştur (Baldock ve ark 2007). Sempatik sinir sisteminde NPY, kardiyovasküler ve sempatik sistemin diğer etkilerini, norepinefrin ve adenozin trifosfat ile düzenler (Brothers ve Wahlestedt 2010). Özellikle osteoblastlarda tespit edilmesi, enerji homeostazından daha başka fizyolojik fonksiyonlarında rol alabileceğini göstermiştir. PYY ve pankreatik polipeptit ise ağırlıklı olarak sırasıyla (Ekblad ve Sundler 2002), bağırsak L hücreleri ve pankreasın pankreatik polipeptit hücrelerinde üretilmektedir. NPY, PYY ve pankreatik polipeptitin beşi klonlanmış olan G-protein-bağlı reseptörleri vardır: Y1, Y2, Y4, Y5 ve Y6 (Lin ve ark 2004).

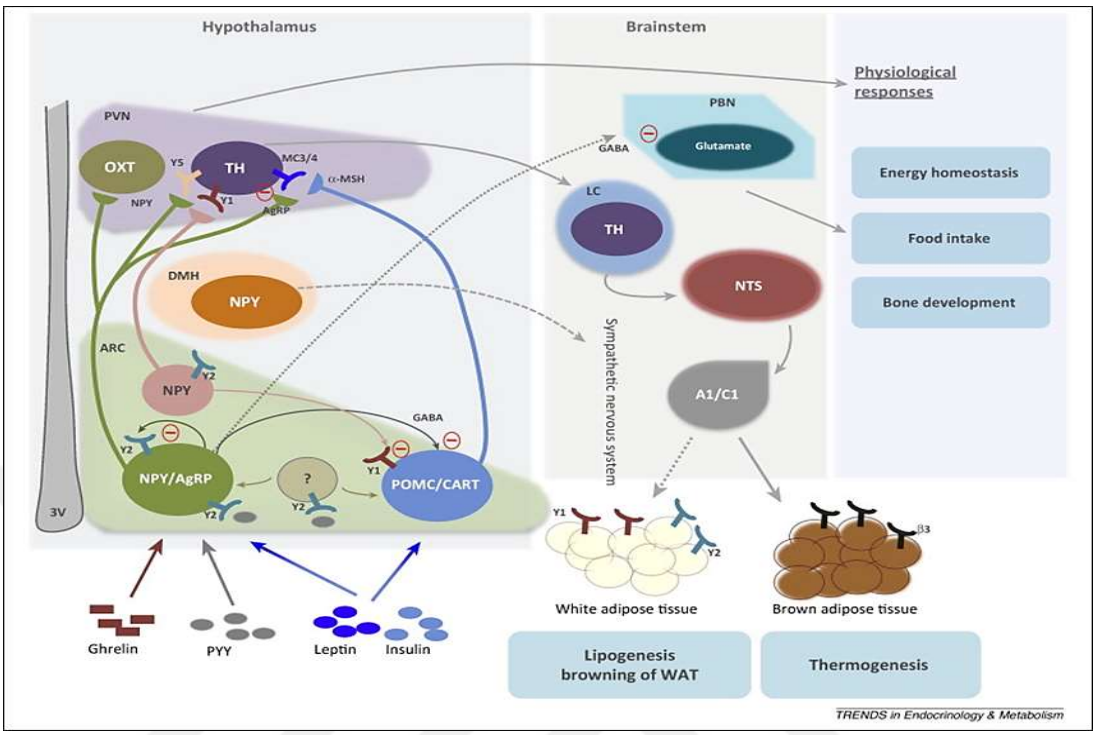
NPY ve enerji homeostazı

Daha önce de belirtildiği gibi, NPY nöronları aynı zamanda AgRP ve GABA eksprese ederken POMC eksprese eden nöronlar da CART'ı eksprese eder (Hahn ve ark 1998). POMC, biri gıda alımını engellemek için melanokortin 3/4 reseptörlerine bağlanan ve anoreksijenik peptit olan α-melanosit uyarıcı hormon olan çoklu peptit hormonlarına ayrılır. NPY, GABA, AgRP nöronları, POMC nöronlarının işlevini doğrudan ve dolaylı yollarla kontrol eder (Loh ve ark 2015) (Şekil 1.2.). Bu görüşe paralel olarak, çalışmalar NPY nöronlarının POMC nöronlarını doğrudan Y reseptör aktivasyonu veya GABA'nın tonik salınımı yoluyla doğrudan inhibe edebileceğini göstermiştir (Acuna-Goycolea ve ark 2005). Dolaylı yoldan ise, α-melanosit uyarıcı hormonun endojen bir antagonisti olan nörotransmitter AgRP ile hipotalamusun özellikle paraventriküler nükleusta nöronlar üzerindeki MC3/4 reseptörleri üzerine inhibisyon yönünde etki eder (Ellacott ve Cone 2004).

Leptin ve insülin de sırasıyla (Hahn ve ark 1998, Schwartz ve ark 2000) hipotalamusa gelir ve gıda alımını engellemek için anoreksik POMC/CART nöron aktivitesini uyarırken NPY/AgRP nöron aktivitesini inhibe ederler (Ahima ve ark 1996, Schwartz ve ark 2000).

Gıda yoksunluğunda arkuat nükleustaki NPY seviyeleri keskin bir şekilde yükselir ve negatif enerji dengesinin modülasyonu için gıda alımında artışla sonuçlanır (Sainsbury ve Zhang 2010). Yine, kemirgenlerde intraserebroventriküler uygulama ile merkezi NPY düzeyinin arttırılması, güçlü hiperfajiye ve morbid

obezite ile sonuçlanır ve buda arkuat nükleustaki NPY'nin oreksijenik etkisini kanıtlar (Sainsbury ve ark 1997).



Şekil 1.2. NPY, Gaba, AgRP nöronlarının POMC nöronları üzerine etkisi (Loh ve ark. 2015)

Periferdeki NPY'nin enerji homeostazının kontrolündeki doğrudan etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. NPY'nin osteoblastlar ve adipositler gibi nöronal olmayan dokularda eksprese edildiği bilinmekte fakat bu NPY kaynağının spesifik işlevine dair kanıtlar yetersizdir.

NPY, gıda alımı üzerindeki etkilerine ek olarak üreme işleviyle de ilişkilidir. Yumurtalıkları alınmış ve östradiol ile tedavi edilen sıçanlarda 48 saat açlık sonrası, NPY ekspresyonunda bir artış bunun yanı sıra Kiss1 gen ekspresyon seviyesi ve serum LH seviyelerinde bir azalma tespit edilmiştir (Kalamatianos ve ark 2008). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, NPY'nin GnRH nöronları üzerinde yer alan Y5 reseptörüne bağlanmasının, nöronları hiperpolarize ettiği ve GnRH sekresyonunu azalttığı, Y5 inhibisyonunun ise GnRH sekresyonunu düzelttiği bildirilmiştir (Xu ve ark 2009).

1.3. Ergenlik ve Çinko

Cinsel olgunlaşmanın başlaması için gereken hormonal mekanizma ve olgunlaşmanın devamı için ise gereken metabolik mekanizma ergenliğin en önemli bileşenleridir. Çinkonun bu süreçlere olan katkısı, biyokimyasal fonksiyonlarıyla açıklanabilir.

Steroid hormonlarının aktivasyonu için çinko gereklidir. Çinko eksikliği ile görülen erkek hipogonadizminin testis steroidogenezindeki veya leydig hücre yetmezliğindeki değişiklikler ile ilişkili olduğu görülmektedir (Martin ve ark 1994, Hamdi ve ark 1997). İnsanlarda serum testosteron konsantrasyonları hücresel çinko konsantrasyonlarıyla doğrudan ilişkilidir çünkü çinko, leydig hücrelerinin testosteron üretmesi ve testosteronun fizyolojik olarak aktif 5-α dihidrotestosterona enzimatik dönüşüm için gereklidir (Wong ve ark 2000). Çinkonun ayrıca optimum sperm fonksiyonu için kromatin, baş-kuyruk eki, penetrasyon ve döllenmeyi stabilize ettiği bilinmektedir (Wong ve ark 2000).

Esas olarak hayvan çalışmalarına dayanan bulgular, kadınlarda çinko eksikliğinin bir dizi patolojik duruma neden olabileceğini düşündürmektedir: FSH ve LH'ın sentezindeki aksaklıklar, anormal yumurtalık gelişimi, adet döngüsünün bozulması, uzamış gebelik süresi, kürtaj, ölü doğumlar, fetüslerin kaba konjenital malformasyonları, aşırı kanamalı gecikmiş ve uzun süreli doğumlar, zor doğum, verimsiz uterus kasılmaları, preeklampsi ve bebeklerin düşük doğum ağırlıkları (Bedwal ve Bahuguna 1994, Cummings ve Kovacic 2009, Wang ve ark 2015). Son zamanlarda, çinkonun oositlerdeki kritik rolünün açıklanmasında da ilerleme kaydedilmiştir. Fare oositleri üzerinde yürütülen çalışmalarda ortaya konmuş ki, profaz I'deki ilk tutulma, MOS-MAPK (MOS-mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz) yolunu etkileyen çinko tarafından sürdürülür (Maret 2013). Olgunlaşma sırasında oositin toplam çinko konsantrasyonu artar. Bu, ilk mayoz bölünme ve ardından metafaz II tutulması için gereklidir. Mayotik hücre döngüsünü sürdürmek için, döllenmiş bir oosit hücre içi çinkoyu hızla atar ve buna "çinko kıvılcımı" denir. Ayrıca, oositteki çinko homeostazı, olgunlaşma sırasında kümülüs hücreleri tarafından düzenlenir (Kim ve ark 2010, Kim ve ark 2011, Kong ve ark 2012, Maret 2013).

Yeni doku sentezi için gereken nükleik asit ve protein sentezi enerjik bir mekanizmadır. Bu enerjik süreçte rol oynayan metalloenzimlerin bir bileşini olan çinko hem bu sebeple hem de iştah kontrolü ve adipokin regülasyonundaki rolü nedeniyle vücut yağlanmasını belirleyebilir. Çinko aynı zamanda ergenliğin metabolik regülasyonu için de önemli olan leptin, ghrelin, insülin ve adiponektin hormonlarını düzenlediği bilinmektedir (Chen ve Lin 2000, Marreiro ve ark 2006). Leptin ve çinko arasındaki ilişki çalışmalar arasında tutarsızdır. Yapılan bir çalışmada obez bireylerin kan mikrobesin konsantrasyonları kontrollere kıyasla daha düşükken, bu eksiklik hem hayvan modellerinde hem de epidemiyolojik çalışmalarda artan yağ birikimi ile ilişkilidir (García ve ark 2009). Bununla uyumlu olarak, obez sıçanlarda düşük çinko yüksek leptin düzeyleri saptanmıştır (Chen ve Lin 2000). Çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda ise kayda değer oranda serum leptin seviyeleri düşük bulunmuştur (Mangian ve ark 1998). Çünkü çinko eksikliği anoreksiya ve düşük vücut ağırlıyla ilişkili olduğundan, esas sekresyon kaynağı yağ dokusu olan leptin düzeyi de azalır. Ayrıca Baltacı ve arkadaşları, çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda plazma leptin düzeylerinin inhibe olduğunu, çinko takviyesinin ise vücut ağırlığında ek bir artışa neden olmadan leptin düzeylerini arttığını bildirmişlerdir (Baltaci ve ark 2005).

Ergenlik başlangıcı için gerekli olan GnRH hormonunun hem memeli hem de memeli olmayan türlerde 20'den fazla formu tanımlanmıştır (Millar 2005). En önemli formlardan olan GnRH-1 formunun işlenmesi için 75 kDa ağırlığında ve çinko metalloendopeptidaz olan EP24.15 tanımlanmıştır. Bu endopeptidaz ilk olarak sıçan beyni homojenatlarının çözünür fraksiyonunda (Orlowski ve ark 1983) tanımlanmış ve çeşitli hücre ve doku tiplerinde yaygın olarak dağılmıştır (Müller ve ark 1997, Tullai ve ark 2000, Gründker ve ark 2001, Tiong ve ark 2004, Ramakrishnappa ve ark 2005).

Çinko parmak (ZNF) genlerinin ise pubertal sürece potansiyel katkısı ZNF131, ZNF462 ve ZNF483'ün yakınında bulunan tek nükleotid polimorfizmlerin daha erken menarş yaşıyla (Perry ve ark 2009) ilişkili olduğu son zamanlarda birkaç genom çalışması tarafından ortaya atılmıştır. Bu çalışmalar, ZNF gen süper familyasının üyelerinin, primatlarda çocuk gelişimi sırasında GnRH puls üretecinin

inhibisyonunun altında yatan bir nörobiyolojik sürecin parçası olduğunu ve sonucunda da erken ergenlik başlangıcını önlediğini gösterebilir.

Alejandro ve arkadaşları tarafından dişi maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ergenlik dönemine geçiş sırasında GATAD1 ve ZNF573'ün hipotalamik ekspresyonunda azalma göstermişlerdir. Ayrıca, bu genlerin, olgunlaşmamış dişi sıçanların ARC'sinde fazla sentezlendiğini, Kiss1 gen ekspresyon düzeyini baskıladığını ve sonuç olarak ergenlik sürecinin uzadığını, östrus siklusunun bozulduğunu belirtmişlerdir. (Lomniczi ve ark 2015).

MKRN3 geni (makorin ring finger protein 3) Prader-Willi sendromu (PWS) kritik bölge kromozom 15q11-S13 bulunur (Jong ve ark 1999). Ailesel merkezi erken ergenlik (CPP) MKRN3 mutasyonları ile karakterizedir.

MKRN3 proteini, 2 adet N-terminal C3H çinko parmak motifine, 1 adet MKRN'ye özgü Cys-His alanına, 1adet C3HC4 RING çinko parmak motifine ve 1 adet C-terminal C3H çinko parmak motifine sahiptir (Jong ve ark 1999) . Abreu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, pubertal başlama ile ilgili MKRN3 geninin fonksiyonunun pubertal pulsatil GnRH sekresyonu inhibe edici yönde etkilediğini ileri sürmüştür (Abreu ve ark 2013). Çalışmaları, erkek ve dişi farelerin arkuat nükleuslarında hipotalamik MKRN3 mRNA düzeylerinin genç yaşta arttığını ve ergenlikten hemen önce azaldığını göstermiştir. MKRN3 mRNA ekspresyonundaki artışın, ergenliğin başlangıcı üzerindeki inhibitör bir etki ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Ojeda ve Lomniczi, MKRN3'ün, Kiss1 gibi hipotalamik GnRH sekresyonunun aktivatörlerini inhibe ettiğini öne sürmüştür (Ojeda ve Lomniczi 2014). Mutasyonuna bağlı MKRN3 eksikliği, GnRH salınımını ve bu nedenle ergenlik başlangıcını hızlandırır (Settas ve ark 2014, Hagen ve ark 2015), erken puberte başlangıcı olan hastalarda saptanamayan veya düşük MKRN3 seviyeleri belirtmişlerdir. Bununla birlikte, MKRN3 seviyeleri prepubertal kızlardan alınan serumdaki gonadotropinler ile negatif korelasyon gösterir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali ve Gruplar

Çalışmamız, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen Wistar cinsi erişkinliğe erişmiş dişi sıçanların yavruları üzerinde ve yine aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulunca 27.12.2019 tarihli 2019-72 karar numarasıyla onaylanmıştır.

Deney grubunu oluşturmak amacıyla 15 adet erişkinliğe erişmiş dişi sıçan, kontrol grubu için ise 5 adet erişkinliğe erişmiş dişi sıçan rastgele seçilmiştir. Seçilen sıçanların çiftleşmesi harem usülü yoluyla gerçekleştirilmiştir. Erkek sıçanlar yaklaşık 10 gün sonra kafeslerden uzaklaştırılmıştır. Devamında gebelik kontrolü günde 2 kez sabah saat 8.00 ve akşam 17.00 olmak üzere yapılmış, vajinal plak varlığı (embriyonik gün 0) ile gebelik belirlenmiştir.

Gebeliği belirlenen 15 adet dişi sıçan deney gruplarını oluşturmak üzere, gebelik başlangıcından yavruların annelerinden ayrılacağı 21. güne kadar çinko eksik (28,20 mg/kg çinko) diyetle beslenmiştir. Deney ve kontrol grubunu oluşturan sıçanlar ise aşağıdaki gibi gruplandırılmıştır.

Deney Grubu

Grup 1 (n=10) Çinko eksik diyetle beslenen grup: Çinko eksik diyetle beslenen annelerinden ayrıldıkları günden, çalışmanın son gününe kadar (66-70 günlük) çinko eksik diyetle (28,20 mg/kg çinko) beslenen dişi yavruların oluşturduğu grup.

Grup 2 (n=10) Normal diyetle beslenen grup: Çinko eksik diyetle beslenen annelerinden ayrıldıkları günden, çalışmanın son gününe kadar (66-70 günlük) sadece standart sıçan yemiyle (130 mg/kg çinko) beslenen dişi yavruların oluşturduğu grup.

Grup 3 (n=10) Çinko takviyeli diyetle beslenen grup: Çinko eksik diyetle beslenen annelerinden ayrıldıkları günden, çalışmanın son gününe kadar (66-70 günlük) standart sıçan yemine ek olarak her gün 5 mg/kg oranında intraperitoneal olarak enjeksiyon yapılan dişi yavruların oluşturduğu grup.

Kontrol Grubu

Grup 4 (n=10) Kontrol grubu: Standart sıçan yemiyle beslenen (130 mg/kg çinko) ve herhangi bir deneysel işlem uygulanmayan 5 adet gebe sıçanlardan doğan, cinsel deneyimi olmayan (66-70 günlük), doğumdan sonra standart sıçan yemiyle beslenmeye devam eden, rastgele seçilmiş dişi yavruların oluşturduğu grup.

Yavrular doğumdan (1.gün) deneysel işlemlerin yapıldığı, çalışmanın son gününe (66-70.gün) kadar, haftalık vücut ağırlıkları değişiklikleri tespit edilmiştir.

2.2. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Deney hayvanlarının beslenmesi her gün yıkanan, hijyenik özel çelik kafeslerde gerçekleştirildi. Yemler bu çelik kaplarda verilirken normal çeşme suyu cam biberonlarda verildi.

Standart sıçan yemiyle beslenen hayvanların günlük beslenmesi, vücut ağırlıklarının 1 kilogramı başına yaklaşık 130 mg yem olarak gerçekleştirildi. Hayvan yemleri ise, pelletler halinde Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Çinko eksik diyet uygulanan gruplardaki özel yemler ise Arden Araştırma ve Deney firmasıdan temin edildi. Deney hayvanlarının barındırıldığı odanın aydınlatması 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde ayarlanırken oda sıcaklığı 21±1 °C'de tutulmuştur.

2.3. Çinko Uygulaması

Çinko takviyeli diyetle beslenen -Grup 2'yi oluşturan- dişi yavrulara kg başına 5 mg çinko sülfat intraperitoneal olarak günlük enjekte edilmiştir.

2.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Tüm gruplardaki hayvanlara, annelerinden ayrıldıktan yaklaşık 66-70 gün sonra ketamine hydrochloride "Ketalar, Parke-Davis" ve xylazine "Rompun, Bayer" karışımı kas içi uygulandı ve hayvanlar genel anestezi altına alındı. Devamında dekapite edilerek sakrifiye edildi. Daha sonra hayvanların kafatası kemikleri kas ve deri tabakasından ayrıldıktan sonra sağ ve soldan beyin dokusuna zarar vermeyecek şekilde kesildi. Kesilen parça künt bir pens ile çıkarıldı. Açığa çıkan beyin doku yine ucu künt bir pensle foramen magnumdan çıkarıldı. Sakrifikasyon öncesi ise kardiyak

ponksiyon yoluyla kan örnekleri alındı. Nihayetinde doku ve kan örnekleri analiz zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

2.5. Hipotalamus Dokusundan RNA İzolasyonu

Hayvanlardan elde edilen hipotalamus dokusunun mRNA seviyeleri Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan PCR cihazı ile ölçüldü. GATAD1 ve Kisspeptin gen ekspresyon düzeyinin, GnRH ve NPY salgılayan nöronların gen ekspresyon düzeyinin çinko tedavisine bağlı değişiklikleri, hipotalamus dokusunun mRNA izolatları üzerinde gerçek zamanlı bir PCR analizi kullanılarak ölçülmüştür.

-80 °C'de muhafaza edilen hipotalamus doku örneklerinden 25-50 mg alındı ve üzerine 1 ml Lysis Buffer (RNA izolasyon reaktifi) çözeltisi ilave edildi. Devamında sonikatör cihazı kullanılarak (SONOPULSmini20, BANDELİN; Almanya) homojen hale getirildi. Her örnek 15 saniye vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Homojenizasyonundan emin olunan karışımın üzerine 200 µL kloroform eklendi. Daha sonra kit kılavuzunda belirtilen şekilde 10 dakika 12000 g'de santrifüj edildi.

Tüpte oluşan süpernatant yeni RNAse içermeyen steril tüpe aktarıldı. Üzerine %70'lik 500 µL etanol ilave edildi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika 12000 g'de santrifüj edilerek hücre kalıntılarından ayrıldı.

Elde edilen çözelti RNA bağlama kolonuna aktarıldı. 12000 × g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi sonunda kolondan geçen çözeltinin toplama tüpünde kalan kısmı döküldü. Kolona sabitlenen nükleik asit molekülünü daha saf hale getirmek için 0,5 ml RPE solüsyonu eklendi ve bu şekilde yine 30 saniye boyunca 12,000 × g'de santrifüj edildi. Aynı işlem birkaç kez tekrar edildi. Bu işlemler sonunda elde edilen çözelti yeni bir 1,5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildi ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi. 30 saniye boyunca 12000 g'de santrifüjlendi. Elde edilen RNA çözeltisi de -80 °C'de saklandı.

2.5.1. mRNA'lardan cDNA Elde Edilmesi

İzole edilen total RNA'daki mRNA'yı cDNA'ya çevirmek için her örnekten eşit miktarda RNA kullanıldı ve hazır ticari kit (OneScript Plus, ABM; Canada)

basamakları takip edildi. Basamaklar tabloda belirtilen protokolle sırasıyla uygulandı (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. RNA-primer karışım içeriği.

Total RNA	25 ng
Random Primer	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
RNAse içermeyen su	25 µl

Hazırlanan RNA-Primer karışımı 65°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi.

Ardından cDNA sentez karışımı aşağıdaki tabloda belirtilen hacimler oranında hazırlandı (Tablo 2.2.). Örnek başına 10 µl alınarak daha önceden hazırlanan RNA-primer karışımı üzerine eklendi. Her tüp pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.

Tablo 2.2. cDNA sentez karışım içeriği.

RT Buffer	4 µl
Rinhibitor	0,5 µl
One ScriptRT	1 µl

Yukarıdaki işlemlerin ardından Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazı ile revers transkripsiyon işlemine geçilmiş ve tablo 2.3'de belirtilen şekilde ısı protokolü uygulanmıştır.

Tablo 2.3. cDNA reaksiyonu için gereken süreler.

25º C	10 dakika (primer bağlanması)
50º C	50 dakika (cDNA sentezi)
85º C	5 dakika (denatürasyon)
4º C	Uzun süre (bekleme)

Bütün bu işlemlerin ardından cDNA'lar elde edildi ve -80º C'de Real Time PCR işlemine kadar muhafaza edildi.

2.5.2. Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Kontrol grubu dokularından elde edilmiş cDNA örneklerinden belirli oranlarda dilüsyon yapılarak (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32) Real Time PCR için standart eğriler çizildi.

Çalışmamızda analizi yapılacak genlerin mRNA düzeyinde ekspresyonları için kullanılan primerler üretici firmada (Sentebiolab, Türkiye) sentezi yaptırılarak elde edildi (Tablo 2.4.). Her bir primerden yaklaşık 50 ng kullanıldı.

Tablo 2.4. Hedef genler için kullanılan primerler.

Gen	Primer Dizisi	Fonksiyon
KISSPEPTIN ileri	5'-GTCACCCATCCAGACTTCAATAA-3'	Hedef Gen
KISSPEPTIN geri	5'-GAAGAGCCACTTGGGTAGTT-3'	Hedef Gen
GATAD1 ileri	5'CAAAGCTCCTGAGTCTGTTTCT-3'	Hedef Gen
GATAD1 geri	5'-CATAGTACGGCTTCCCATCTTG-3'	Hedef Gen
GnRH ileri	5'-CCAAACACACAGTCAACAGAAC-3'	Hedef Gen
GnRH geri	5'CTCTGTGTCTTGATGTCCCTTAG-3'	Hedef Gen
NPY ileri	5'-TATCCCTGSTCGTGTGTTTG-3'	Hedef Gen
NPY geri	5'-TCGCAGAGCGGAGTAGTAT-3'	Hedef Gen

cDNA'ların referans gen amplifikasyonunu sağlamak için hazır ticari kit (FastStart Essential DNA Green Master, İsviçre) kullanıldı. Ticari kitteki belirtilen hacimlere uygun olacak şekilde karışım hazırlandı (Tablo 2.5.)

Tablo 2.5. Real time pcr primer master mix içeriği.

Master Mix	10µl
forward Primer (10 pmol/µl)	1µl
reverse Primer (10 pmol/µl)	1µl
Cdna	1µl
H_20	7µl
Total Volume	20µl

Real Time PCR analizlerinde CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Amerika) cihazı kullanıldı. Hazırlanan Real Time PCR mix'leri uygun cDNA'lar biraraya getirildi. Sisteme ait 96 kuyucuklu plate üzerine eklendi.

Aşağıdaki tabloda belirtilen ısı protokolü uygulanarak Biorad connect cihazında RT-PCR işlemine alındı (Tablo 2.6.).

Tablo 2.6. Real time pcr ısı protokolü.

Denatürasyon	95°C de 10 dk.
Amplifikasyon: 45 kez tekrar eder.	95 °C de 10 sn (denatürasyon) 60 °C de 10 sn (bağlanma) 70°C de 10 sn (polimerizasyon)
Melting Curve	95°C de 15 sn. 60 °C de 10 sn. 95 °C de 10 sn
Cooling	40 °C de 1 dk.

Elde edilen sonuçların analizi, Biorad connect cihazının quantification analiz programıyla yapıldı. Her bir örnek için referans ve hedef CT değerleri belirlendi ve delta CT formülünde yerine konarak hesaplandı.

2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

2.6.1. Serum Çinko Analizi

Deney hayvanlarından kardiyak ponksiyon ile alınan kan örnekleri santrifüj edildi. Serumları ayrıştırıldıktan sonra steril tüpler içerisinde analiz zamanına kadar -80 °C'de bekletildi.

Serum örnekleri, %1'lik Triton X-100 (Sigma Chemical Co: T-9284) çözeltisi ile 1/50 oranında dilue edildi. Çinko konsantrasyonlarının tespiti ise Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak bölümünde bulunan inductively coupled plasma emission spectrophotometry (ICP-AES; Varian Australia Pty LTD, Australia) atomik emisyon cihazında ve verilerin birimi µg/dl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.6.2. Hipotalamus Dokusunda NPY, Kisspeptin, Leptin, GnRH, FSH, LH Analizi

Protein analizleri, elisa yöntemiyle elabsicence marka ve sıçanlar için özel tasarlanmış kitler ile gerçekleştirildi. Protein düzeyleri ise BMG LACTECH (Almanya) ile belirlendi.

Elisa kit içerikleri; 96 kuvetten oluşan mikroküvet, yıkama solusyonu (20X), standart stok, antikor, HRP-konjugat, substrat A-B, TMB substrat, stop solüsyon, biotinylated Rat Antibody (her bir protein için ayrı), standart dilüsyon çözeltisinden oluşmaktadır.

NPY, kisspeptin, leptin, GnRH, FSH, LH hormonları için kullanılan kitlerin katalog numarası sırasıyla; C, E-EL-R2530 96T, E-EL-RO582 96T, E-EL-R0451 96T, E-EL-R0391 96T, E-EL-R0026 96T'dir.

Analizin yapılışı:

1) Blanck, standart ve numune kuyuları 96 kuyucuklu plate üzerinde blanck, standart ve numune kuyuları belirlendi.

2) Standart kuyucuklarına 50 µL kit içeriğine göre seyreltilmiş standartlar ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi.

3) Numune kuyularına ise 40 µL numune, her bir protein için ayrı 10 µL antikor ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi.

4) Plate nazikçe karıştırılarak sızdırmaz bir membran vasıtasıyla üzeri kapatıldı. İnkübasyon süresi 1 saat olacak şekilde 37°C'de inkübe edildi.

5) Plate, inkübasyondan sonrası yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı.

6) Daha sonra her kuyucuğa her ikisinden de 50 µl miktarında substrat solüsyonu A ve B eklenerek renk değişimi için karanlık ortamda 37°C'de 10 dakika inkübe edildi

7) İnkübasyon sonrası ise her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için 50 µL stop solüsyonu eklendi.

8) 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda her bir kuyunun optik dansitesi BMG-LABTECH marka SPECTRO star Nano Elisa (Germany) cihazında ölçüldü. Birimleri ng/ml olarak hesaplandı.

2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm sonuçlar, IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Armonk, New York, ABD) istatistik programında değerlendirilmiştir. Tüm sonuçların aritmetik ortalamaları ve standart hataları belirlenmiş, "Shapiro-Wilk" testi yapılarak verilerin homojenliği teyit edilmiştir. Gruplar arasındaki değerlendirmeler tek yönlü varyans analiz testi olan ANOVA testi ile yapılmıştır. ANOVA testinde istatistiksel olarak anlamlı çıkan sonuçların çoklu karşılaştırılması ise Duncan testi ile yapılmış ve $p<0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

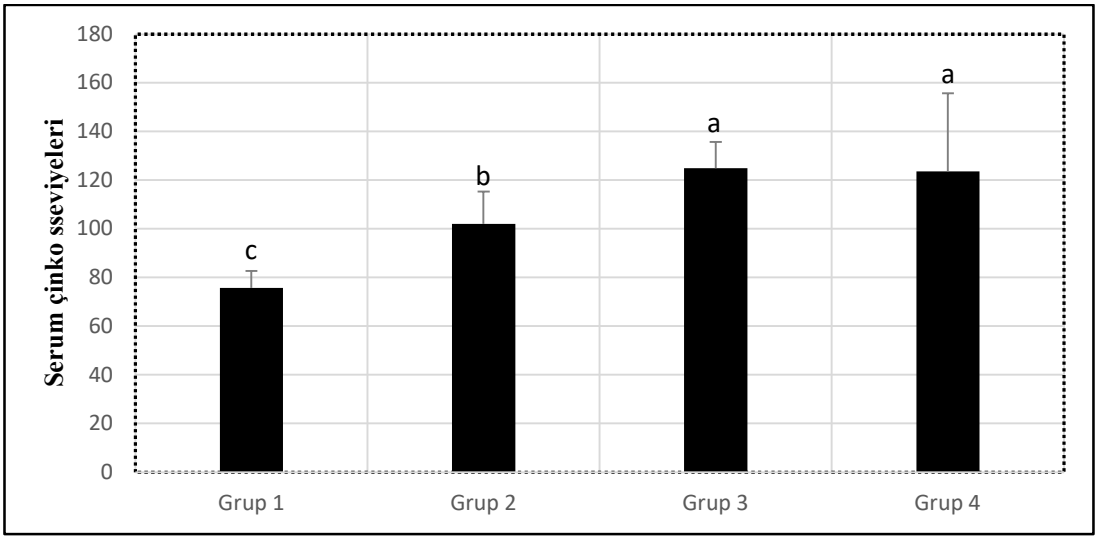
3.1. Serum Çinko Seviyeleri Bulguları

Çalışmamızda uyguladığımız intraperitonel çinko takviyeleri ve çinko eksik diyet uygulamaları sonucunda en düşük çinko seviyesi, çinko eksik diyetle beslenen grup 1'de elde edildi ($p<0,05$). En yüksek çinko seviyeleri ise, grup 3 ve grup 4'te görüldü ($p<0,05$). Grup 3 ve grup 4 arasındaki fark ise anlamlı değildi. Grup 2'nin serum çinko seviyelerine bakıldığında, grup 1'den yüksek iken grup 3 ve grup 4'ten anlamlı bir şekilde düşüktü ($p<0,05$, Tablo 3.1., Grafik 3.1.).

Tablo 3.1. Grupların çinko seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	$75,81 \pm 6,92^{c}$
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	$102,04 \pm 13,27^{b}$
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	$124,95 \pm 10,84^{a}$
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	$123,68 \pm 32,08^{a}$

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.1. Grupların serum çinko seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).

3.2. RT-PCR Bulguları

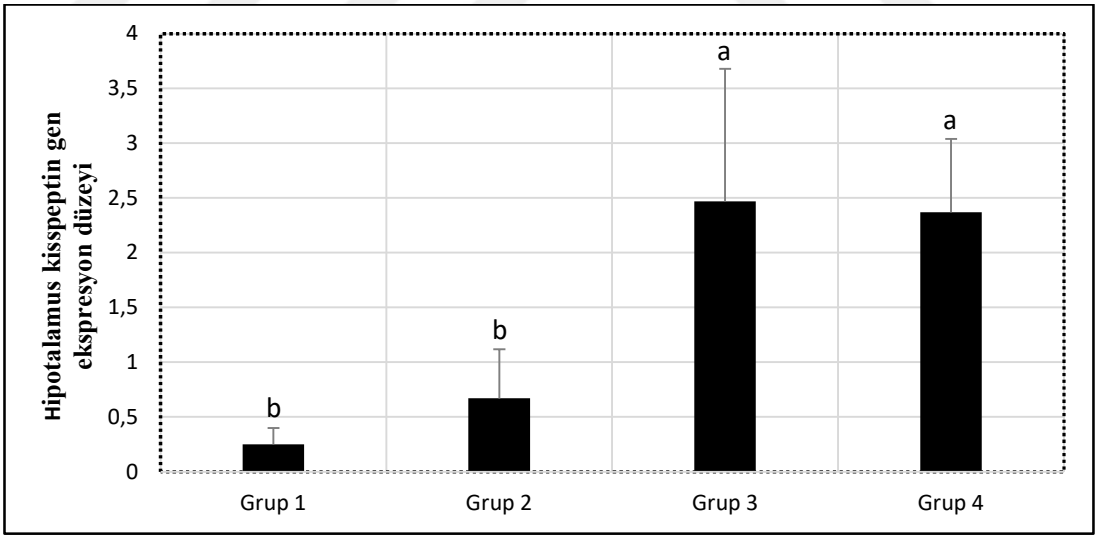
3.2.1. Kisspeptin Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları

Tez çalışmamızda, kisspeptin gen ekspresyon düzeyi grup 3 ve 4'te diğerlerine göre anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Bunun yanı sıra, grup 1 ve 2'de ise gen ekspresyon düzeyi en düşüktü ($p<0,05$). Grup 3 ve 4 ile grup 1 ve 2 arasındaki fark ise anlamlı değildi (Tablo 3.2., Grafik 3.2.).

Tablo 3.2. Grupların kisspeptin gen ekspresyon seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	$0,25 \pm 0,15^{b}$
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	$0,67 \pm 0,45^{b}$
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	$2,47 \pm 1,21^{a}$
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	$2,37 \pm 0,67^{a}$

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.2. Grupların kisspeptin gen ekspresyon seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).

3.2.2. GATAD1 Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları

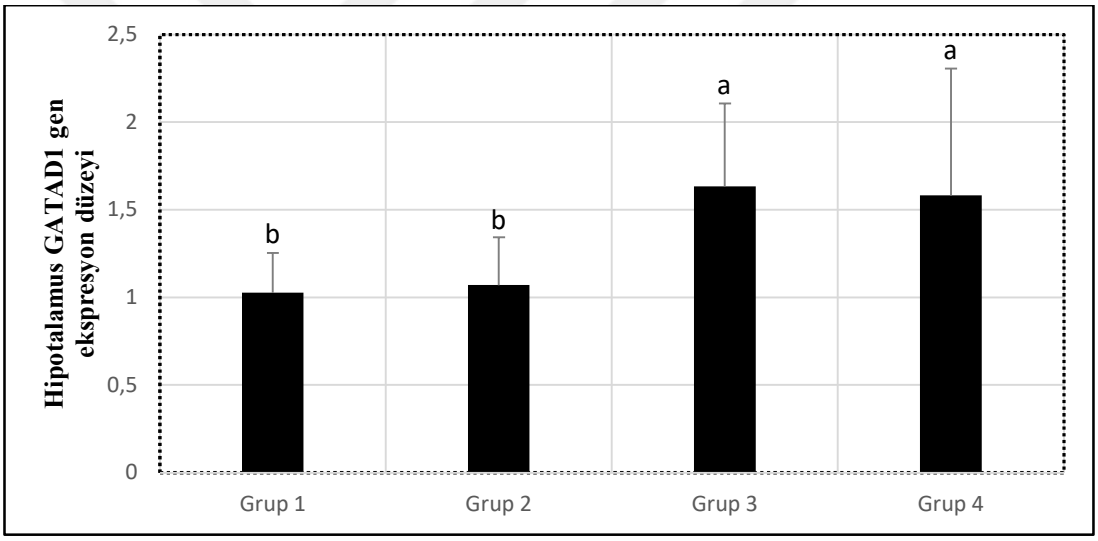
Çalışmamızda, gruplar arasındaki GATAD1 gen ekspresyon düzeyi grup 3 ve grup 4'te diğerlerine göre önemli ölçüde yüksek bulundu ($p<0,05$). Grup 1 ve 2'de

ise gen ekspresyon düzeyi en düşüktü ($p<0,05$). Grup 3 ve 4 ile grup 1 ve 2 arasındaki fark ise anlamlı değildi (Tablo 3.3., Grafik 3.3.).

Tablo 3.3. Grupların GATAD1 gen ekspresyon seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	$1,03 \pm 0,23^{b}$
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	$1,07 \pm 0,27^{b}$
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	$1,63 \pm 0,47^{a}$
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	$1,58 \pm 0,73^{a}$

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.3. Grupların GATAD1 gen ekspresyon bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).

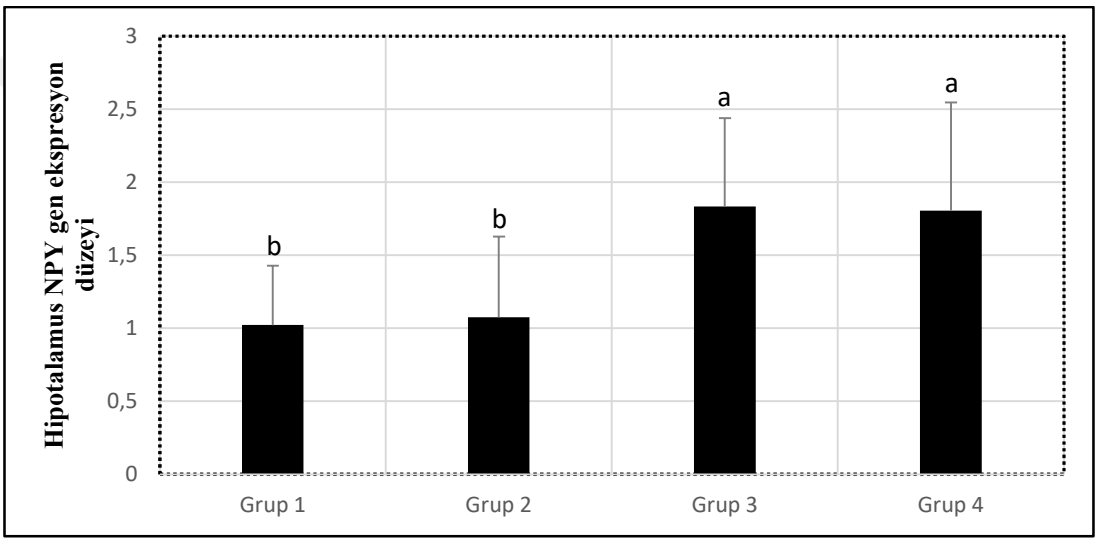
3.2.3. NPY Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları

Mevcut çalışmada, NPY gen ekspresyon düzeyi grup 3 ve 4'te diğerlerine kıyasla daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Grup 1 ve 2'de ise gen ekspresyon düzeyi en düşüktü ($p<0,05$). Grup 3 ve 4 kendi arasında, grup 1 ve 2 kendi arasında kıyaslandığında ise aralarındaki fark anlamlı bulunamadı (Tablo 3.4., Grafik 3.4.).

Tablo 3.4. Grupların NPY gen ekspresyon seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	1,02 ± 0,40[b]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	1,08 ± 0,55[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	1,83 ± 0,61[a]
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	1,80 ± 0,74[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.4. Grupların NPY gen ekspresyon seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).

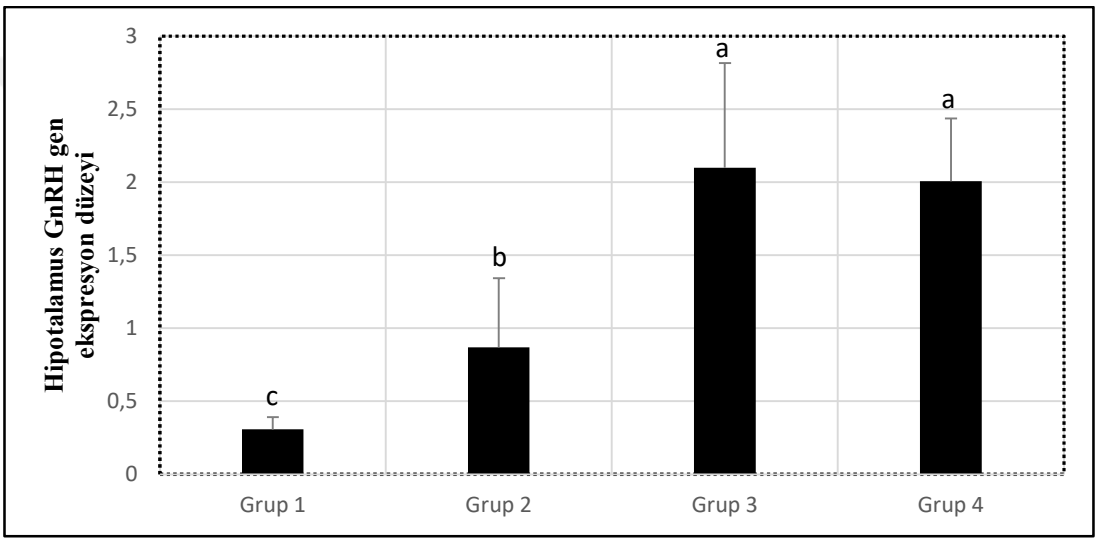
3.2.4. GnRH Gen Ekspresyon Seviyeleri Bulguları

Çalışmamızda, gruplar arasındaki GnRH gen ekspresyon seviyesi grup 3 ve 4'te diğerlerine göre daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Grup 3 ve 4'ün kendi aralarında ise anlamlı bir farklılık bulunmadı. Grup 1'de, GnRH gen ekspresyon düzeyi diğerlerine kıyasla önemli bir şekilde düşüktü ($p<0,05$, Tablo 3.5., Grafik 3.5.).

Tablo 3.5. Grupların GnRH gen ekspresyon seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	0,31 ± 0,83[c]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	0,87 ± 0,47[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	2,10 ± 0,72[a]
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	2,01 ± 0,43[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.5. Grupların GnRH gen ekspresyon seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).

3.3. ELISA Bulguları

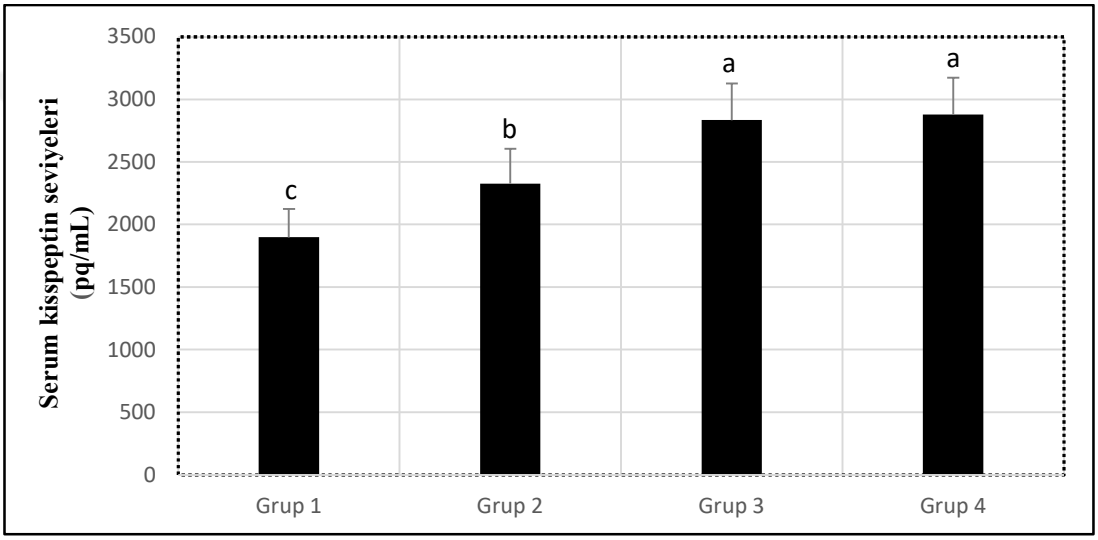
3.3.1. Kisspeptin Bulguları

Tez çalışmamızda, gruplar arasındaki serum kisspeptin düzeyleri en yüksek grup 3 ve 4'te belirlendi ($p<0,05$). Bu iki grup arasında ise anlamlı bir fark çıkmadı. Bunun yanı sıra, en düşük serum kisspeptin seviyesi ise grup 1'de belirlendi ($p<0,05$, Tablo 3.6, Grafik 3.6.).

Tablo 3.6. Grupların serum kisspeptin seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	1898,7 ± 227,4[c]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	2326,7 ± 279,7[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	2834,7 ± 293,7[a]
Grup4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	2878,4 ± 294,6[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.6. Grupların serum kisspeptin seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c)

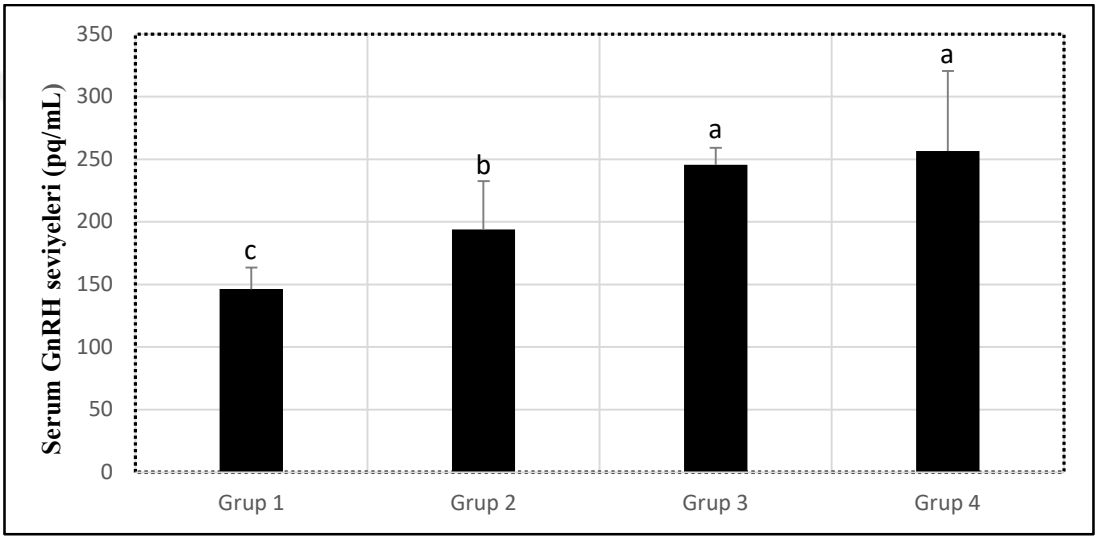
3.3.2. GnRH, FSH, LH Bulguları

Çalışmamızda, serum GnRH düzeyleri en yüksek grup 3 ve 4'te belirlendi ($p<0,05$). Bu iki grup arasında ise anlamlı bir fark çıkmadı. Ayrıca, en düşük serum GnRH seviyesi grup 1'de belirlendi ($p<0,05$, Tablo 3.7., Grafik 3.7.).

Tablo 3.7. Grupların serum GnRH seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	146,25 ± 17,43[c]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	193,95 ± 38,77[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	245,66 ± 13,48[a]
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	256,68 ± 63,85[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



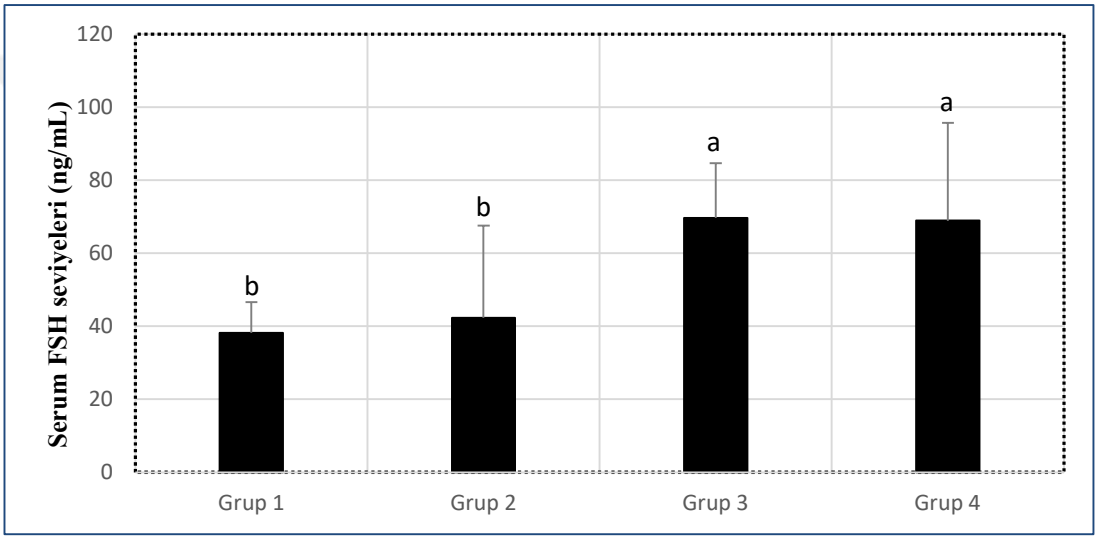
Grafik 3.7. Grupların serum GnRH seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c)

Serum FSH düzeylerinde ise, gruplar arasında en yüksek FSH seviyesi grup 3 ve 4'te belirlendi ($p<0,05$). Bu iki grup arasındaki fark ise anlamlı değildi. Yine serum FSH seviyesi düşük olan grup 1 ve grup 2 arasındaki fark anlamlı değildi (Tablo 3.8., Grafik 3.8.).

Tablo 3.8. Grupların serum FSH seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	38,16 ± 8,48[b]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	42,28 ± 25,27[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	69,68 ± 15,02[a]
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet Kontrol	68,92 ± 26,79[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



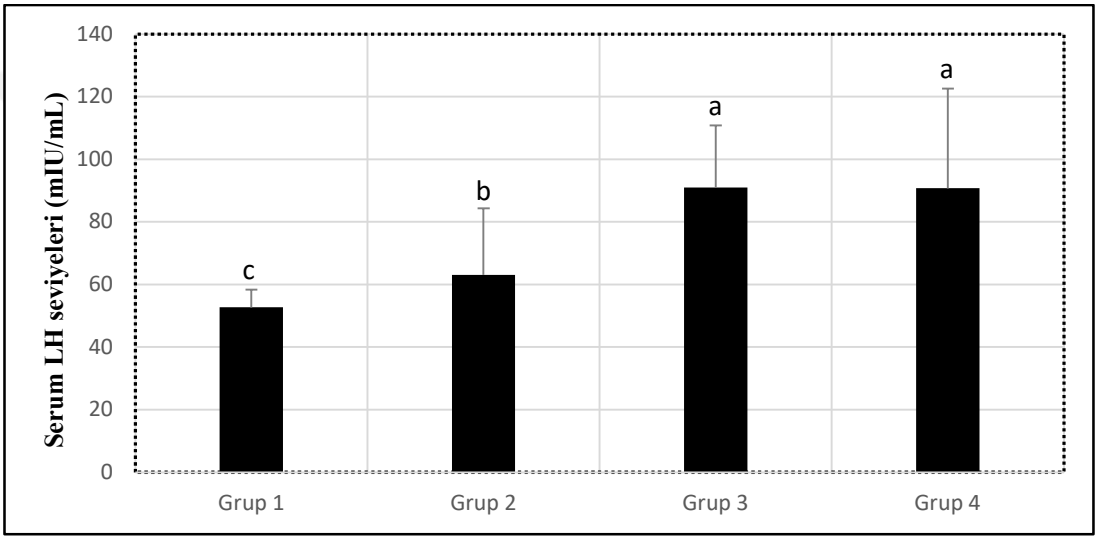
Grafik 3.8. Grupların serum FSH seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c)

Serum LH düzeylerinde ise, gruplar arasında en yüksek LH seviyesi grup 3 ve 4'te belirlendi ($p<0,05$). En düşük LH seviyesi ise, bütün gruplara kıyasla anlamlı bir şekilde grup 1'de bulundu ($p<0,05$, Tablo 3.9., Grafik 3.9.).

Tablo 3.9. Grupların serum LH seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	52,69 ± 5,73[c]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	63,05 ± 21,33[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	90,95 ± 19,92[a]
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	90,74 ± 31,93[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.9.Grupların serum LH seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c)

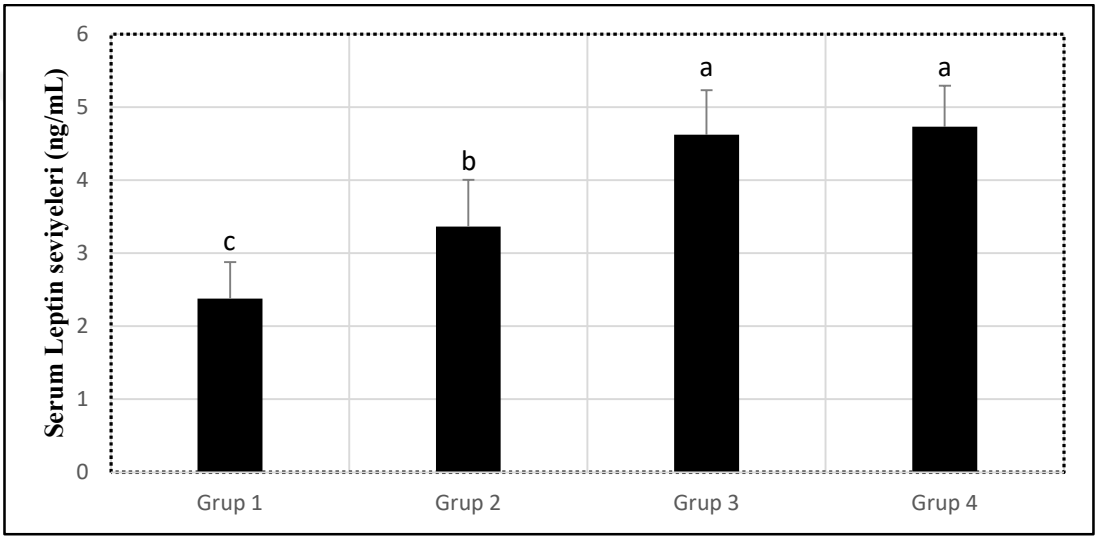
3.3.3. Leptin Bulguları

Mevcut çalışmada, serum leptin düzeyleri grup 1'de diğer bütün gruplara kıyasla önemli ölçüdü düşük bulundu ($p<0,05$). En yüksek leptin seviyesi ise diğer gruplara kıyasla grup 3 ve 4'te bulundu ($p<0,05$). Bu iki grup arasındaki fark ise anlamlı değildi (Tablo 3.10., Grafik 3.10.)

Tablo 3.10. Grupların serum Leptin seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	2,38 ± 0,50[c]
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	3,36 ± 0,64[b]
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	4,62 ± 0,61[a]
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	4,73 ± 0,56[a]

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.10.Grupların serum leptin seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c)

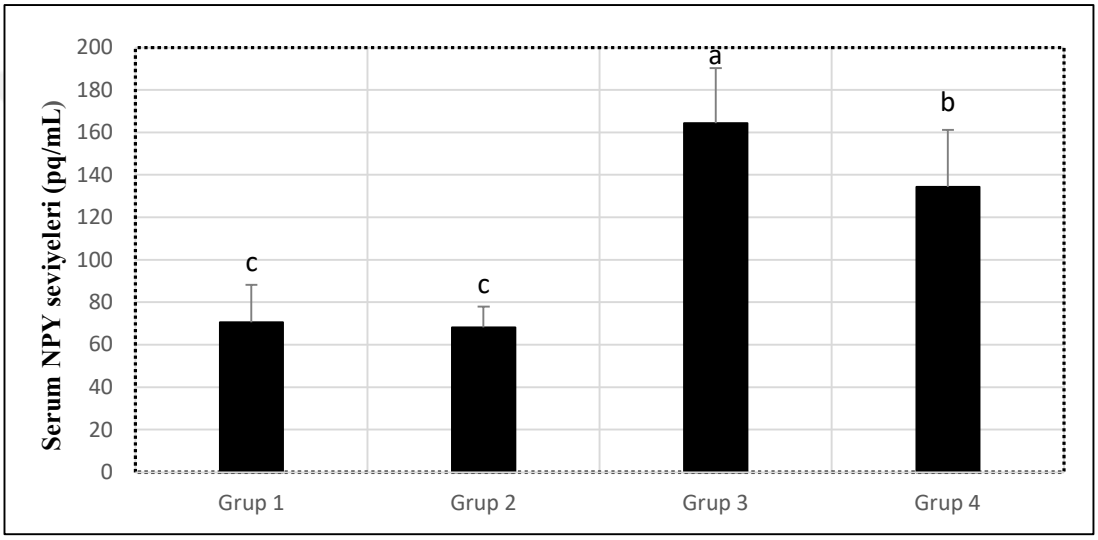
3.3.4. NPY Bulguları

Çalışmamızda, serum NPY seviyeleri bütün gruplara kıyasla en yüksek grup 3'te bulundu ($p<0,05$). Grup 1 ve 2'de ise seviyelerin diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde düştüğü belirlendi ($p<0,05$, Tablo 3.11., Grafik 3.11.). Grup 1 ve grup 2'deki farklılık ise anlamlı değildi. Grup 4 NPY seviyeleri, grup 1 ve 2'den yüksek; grup 3'ten anlamlı bir şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Tablo 3.11. Grupların serum NPY seviyeleri bulguları.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 Maternal Çinko Eksik + Çinko Eksik Diyet	70,56 ± 17,68^{c}
Grup 2 Maternal Çinko Eksik + Standart Diyet	68,21 ± 9,8^{c}
Grup 3 Maternal Çinko Eksik + Çinko Takviye	164,43 ± 25,86^{a}
Grup 4 Maternal Standart + Standart Diyet, Kontrol	134,43 ± 26,75^{b}

a,b,c: Aynı sütunda yer alan ortalamalarda farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c).



Grafik 3.11.Grupların serum NPY seviyeleri bulguları. Farklı harf ile belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). (a>b>c)

4. TARTIŞMA

4.1. Serum Çinko Bulgularının Tartışılması

Tez çalışmamızda, en düşük çinko seviyeleri maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve çinko eksik diyetle beslenmiş grup 1'de tayin edilirken; en yüksek serum çinko seviyesi, maternal çinko eksikliği oluşturulmuş devamında çinko takviyesi yapılmış grup 3 ve kontrol grubu grup 4'te elde edildi. Bu bulgular ışığında, 66-70 gün boyunca uyguladığımız çinko eksik diyetin beklenen sonuçları verdiğini görmekteyiz. Yine intraperitonel yöntemle uyguladığımız çinko takviyesinin, maternal çinko eksikliği sonucunda gelişen çinko eksikliğini kontrol grubuna yaklaştırarak restore ettiği sonucuna ulaşmaktayız. Maternal çinko eksikliğini restore edebilmek ve kontrole yaklaştırmak için standart diyetin yetersiz kaldığı, çinko takviyesinin gerekli olduğu sonucunu da çıkartabiliriz.

4.2. PCR Testi Bulgularının Tartışılması

4.2.1. Kisspeptin Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Hipotalamik kisspeptin nöronları, üreme fonksiyonunun düzenleyici merkezi olarak kabul görürler. Bu nöronlar, üreme eksenini kontrol etmek için GnRH nöronlarından GnRH salınımını modüle eden peptitlerdir. Merkezi veya periferik kisspeptin uygulaması, sıçanlarda, farelerde, koyunlarda, domuzlarda, atlarda ve insan altı primatlarda güçlü LH ve FSH salınımına yol açar (Hameed ve ark 2011).

Literatürde dişiler üzerinde kisspeptin ve çinko arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmaya rastlanmadı. Bizim çalışmamızda, kisspeptin gen ekspresyon düzeyleri en yüksek maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve devamında çinko takviyesi yapılan grup 3'te ve grup 4'te (kontrol grubu) saptandı. En düşük seviyelere ise, grup 2 (maternal çinko eksikliği oluşturulmuş standart diyetle beslenen grup) ve grup 1'de (maternal çinko eksikliği oluşturulmuş devamında çinko eksik diyetle beslenen grup) rastlandı. Grup 3'te kisspeptin gen ekspreyon düzeyinin grup 1 ve grup 2'ye kıyasla anlamlı bir şekilde artmış olması, maternal çinko eksikliği oluşturulmuş sıçanlarda çinko takviyesinin kisspeptin gen ekspresyonunu uyardığı yorumunu yaptırabilir. Grup 4 ile grup 2 arasındaki anlamlı farklılık, standart diyetin maternal çinko eksikliğinde kisspeptin gen ekspresyon seviyesini yükseltemediğini göstermiştir.

Sadece çinko takviyesi ile gen ekspresyon düzeyleri kontrol seviyelerine yaklaşmıştır.

4.2.2. GATAD1 Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Dişi maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ergenlik dönemine geçiş sırasında GATAD1 ve ZNF573'ün hipotalamik ekspresyonunda azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, bu genlerin, olgunlaşmamış dişi sıçanların ARC'sinde fazla sentezlendiğini, Kiss1 gen ekspresyon düzeyini baskıladığını ve sonuç olarak ergenlik sürecinin uzadığını, östrus siklusunun bozulduğunu belirtmişlerdir (Lomniczi ve ark 2015).

Mevcut çalışmamızda, GATAD1 gen ekspresyon düzeylerine en yüksek grup 3'te ve grup 4'te saptandı. En düşük seviyelere ise, grup 2 ve grup 1 beslenen gruplarda rastlandı. Grup 3 ile grup 1 ve grup 2 arasında görülen anlamlı farklılık, çinko takviyesinin GATAD1 gen ekspresyon düzeyini uyardığını gösterir. Maternal çinko eksikliği oluşturulmuş 3 grup arasından sadece çinko takviyesi yapılan grup 3'te GATAD1 gen ekspresyon düzeyinin kontrol seviyelerine yaklaştığı görülmüştür. Yani, Kiss1 gen ekspresyonunu baskılayan GATAD1'in çinko tarafından uyarıldığı görülmüştür. Ayrıca kisspeptin ve GATAD1 gen ifade düzeyinin gruplar arası benzer sonuçlar vermesi, Lomniczi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla tutarlık göstermemesinin nedeni bizim çalışmamızdaki bir diğer değişken olan çinkonun veya bilinmeyen başka bir mekanizmanın etkisiyle açıklanabilir (Lomniczi ve ark 2015). Çinkonun, GATAD1, Kiss1 geni ve çinko arasındaki ilişkinin daha fazla sayıda çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

4.2.3. NPY Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

NPY, merkezi sinir sisteminde ve periferik sinir sisteminde yaygın olarak eksprese edilen 36 aminoasit içeren oreksijenik bir proteindir. Sıçanlarda intraserebroventriküler olarak yapılan NPY infüzyonunun gıda alımını uyardığı görülmştür (Kohno ve Yada 2012).

Hipotalamustaki arkuat nükleus, NPY nöronlarının fazlaca bulunduğu bölümdür ve beslenmenin düzenlenmesi için kritik role sahiptir. Ayrıca arkuat nükleus bölümü anatomik olarak kan beyin bariyerinin bulunmadığı bölge olarak kabul edilir (Shaver ve ark 1992, Rodríguez ve ark 2010, Ciofi 2011). Yine bu

bölgedeki kılcal damarların çoğu pencerelidir ve bu nedenle diğer hipotalamik bölgelere kıyasla moleküler geçirgenlik oldukça yüksektir. Böylece periferik sinyaller doğrudan NPY nöronlarına ulaşabilir.

Çalışmamızın bulgularına bakıldığında, NPY gen ekspresyon düzeyi anlamlı olarak grup 3'te ve grup 4'te diğer iki gruba göre yüksekti. Bu anlamlı farklılık, NPY gen ekspresyon düzeyinin, maternal çinko eksikliği oluşturulmuş dişi sıçanlarda sadece çinko takviyesiyle kontrole yaklaştığını göstermektedir. Literatürde çinko eksikliğinin gıda alımında azalmaya neden olacağını bildiren çokça çalışma yer almıştır (Chesters ve Quarterman 1970, Chesters ve Will 1973, O'Dell ve Reeves 1989). Komai ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bulgularımıza benzer şekilde, oral olarak verilen çinkonun kısa süreli çinko eksikliği oluşturulmuş sıçanlarda gıda alımını uyardığını, oreksin ve NPY'nin mRNA ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada uyarılan gıda alımı vagotomi ile ortadan kalkmıştır bu durum çinkonun gıda alımını afferent vagus siniri yoluyla uyardığını sonuçta hipotalamik peptiti aktive ettiği bildirilmiştir (Komai ve ark 2018). Yine benzer bir çalışmada, çinko klorür içeren yeterli bir diyetin, kısa süreli çinko eksikliğinden sonra gıda alımını akut olarak uyardığı ve oral yoldan verilen çinko sülfatın, NPY ve oreksin mRNA ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Suzuki ve ark 2011). Bazı çalışmalarda ise, çinko eksikliği olan sıçanlarda NPY ve NPY mRNA seviyelerinde artış görüldüğü bildirilmiş fakat NPY değerleri yüksek olduğu halde gıda alımının düşük kaldığı da görülmüştür (Selvais ve ark 1997, Lee ve ark 1998). Araştırmacılar bu durumu çinko eksikliğinin NPY'ye karşı bir direnç oluşturabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

4.2.4. GnRH Gen Ekspresyon Bulgularının Tartışılması

Kisspeptin ve GnRH aksonları arasında akso-somatik, akso-dendritik ve akso-aksonal sonlanmalar gösterilmiştir (Clarkson ve Herbison 2006, Ramaswamy ve ark 2008, Smith ve ark 2008, Hrabovszky ve ark 2010, Uenoyama ve ark 2011). Ayrıca kisspeptinin, GnRH'yi portal sisteme serbest bırakmak için Kiss1r reseptörüne bağlanarak doğrudan GnRH nöronlarını uyardığı bildirilmiştir. bu da LH ve FSH'ın ön hipofiz gonadotroplarından salgılanmasını uyarır (Clarke ve Cummins 1985). GnRH ise, hipofiz gonadotroplarındaki G proteinine bağlı reseptör ailesine ait spesifik reseptörlerine bağlanır. Etkilerini protein kinaz C yoluyla, inositol 1,4,5-

trifosfat ve diasilgliserol üretimi ile gösterir. Bu ikinci haberciler sitozolde kalsiyum miktarını arttırarak gonadotropin salgılanması uyarır. GnRH reseptörlerinin GnRH tarafından uzun süreli aktivasyonu, desensitizasyona ve dolayısıyla baskılanmış gonadotropin sekresyonuna yol açar.

Çalışmamızda, GnRH gen ekspresyon düzeyleri gruplar arasında en düşük grup 1'de tayin edildi. En yüksek seviyesi ise, grup 3 ve grup 4'te görüldü. Ayrıca maternal çinko eksikliği oluşturulmuş 3 gruptan en düşük seviyeyi gösteren çinko eksik diyetle beslenen grup gösterdi ki çinko eksikliği GnRH gen ekspresyonunu azalttı, takviyesi ise ekspresyon düzeyini anlamlı bir şekilde arttırdı. Bu bulgularımız çinko eksikliğinin, hipogonadik hipogonadizme neden olduğunu gösteren çalışmalarla tutarlık göstermiştir (Prasad ve ark 1961, Hafiez ve ark 1989). Kaswan ve Bedwal, çinko eksikliği oluşturulan farelerin yumurtalıklarında elektron ve ışık mikroskopu ile yaptıkları gözlem sonucunda çinko eksikliğinin hipotalamus tarafından enerji, protein alımı ve GnRH sekresyonunda, hipofiz tarafından LH ve FSH sekresyonunda azalmaya neden olabileceğini ve devamında yumurtlamanın durması veya yumurtalıkta büyüyen foliküllerin atrezisi gelişebileceğini bildirmişlerdir (Kaswan ve Bedwal 1995).

Çinkonun pubertal süreçte GnRH gen ekspreyon düzeyine etkisini araştıran çalışmalar, erkeklerin aksine, dişilerde yok denecek kadar azdır. Literatürde bu tür çalışmaların artması gerektiği görülmüştür.

4.3. ELISA Testi Bulgularının Tartışılması

4.3.1. Serum Kisspeptin Bulgularının Tartışılması

Kiss1 geni tarafından kodlanan 145 amino asitli bir nöropeptid olan kisspeptin, GnRH nöronları üzerindeki reseptörüne bağlanarak GnRH salınımına neden olur ve bu da ön hipofizden LH ve FSH salgılanmasını uyarır (Rønnekleiv ve Kelly 2013). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, Kiss1 ve Kiss1r genlerinin sadece hipotalamik bölgede değil testis, yumurtalık, yağ dokusu, karaciğer, plasenta, pankreas, dalak, akciğerler, kalp ve hipofiz gibi periferik dokularda da eksprese edildiğini göstermiştir (Kotani ve ark 2001, Sitticharoon ve ark 2013, Cao ve ark 2019, Xin ve ark 2019). Bu bulgular, periferik kisspeptinin insanlarda üreme (Latif ve Rafique 2015) ve metabolik düzenlemelerle ilişkili olabileceğini

düşündürmektedir (Pan ve ark 2016, Bacopoulou ve ark 2017, Izzi-Engbeaya ve ark 2018).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, bütün gruplar arasında en düşük serum kisspeptin grup 1'de görüldü. Grup 3 ve grup 4 kisspeptin düzeyleri grup 1 ve grup 2'ye göre anlamlı olarak yüksekti. Buna göre, yetersiz çinko alımının serum kisspeptin düzeylerini önemli ölçüde azalttığı, çinko takviyesinin ise kontrol değerlerine yaklaştırdığı görülmüştür. Maternal çinko eksikliğinde görülen serum kisspeptin düzeylerindeki azalmanın ise sadece çinko takviyesi ile kontrole yaklaştığı görülmüştür.

Kisspeptin sentezinin, salgısının uyarılması ve yolakları hakkındaki bilgi yetersizdir. Beslenmeyi düzenleyen yolakların kisspeptin nöronlarını da uyardığı bilinmektedir (Sobrino ve ark 2022). Serum kisspeptin ve çinko arasındaki ilişkiyi dişiler üzerinde inceleyen bir çalışmaya ise literatürde rastlanmadı. Kisspeptin sentezleyen nöronların, bazal hipotalamusun fenestre alanında yer alan hipofizyal medial eminens aksonal projeksiyonlar göndermesi ve bu nedenle bu nöronal popülasyonun doğrudan dolaşımdaki besinlerle etkileşim halinde olması çinko eksikliğinin de bu nöronları etkilediğini düşündürebilir.

4.3.2. Serum GnRH, FSH, LH Bulgularının Tartışılması

Çinko, üreme sistemi hücrelerinin farklılaşması ve çoğalması için kritik bir öneme sahiptir. Her iki cinsiyetin üreme sisteminde kritik bir rol oynar. Spermatozoa gelişimi, ovülasyon, fertilizasyon, normal gebelik, fetal gelişim ve doğum için gereklidir (Vallee ve Falchuk 1993, Ebisch ve ark 2007, Cummings ve Kovacic 2009). Ancak, çinkonun dişi üreme sistemi üzerindeki etkileri hakkında, erkeklere nispeten, daha az şey bilinmekte olup yapılan çalışmalar nispeten daha azdır (Ebisch ve ark 2007, Cummings ve Kovacic 2009). Shaw ve arkadaşlarının dişi tavşanlar üzerine yaptıkları bir çalışmada, çinko eksikliğinin erkeklere karşı ilgisizliğe ve ovülasyonun gerçekleşmemesine yol açtığını belirtmişlerdir. Ayrıca, bu tavşanların endometrium kanlanmasının yetersiz olduğunu ve bu tavşanların gebe kalamadığını belirtmişlerdir (Shaw ve ark 1974). Çinko eksikliğinin ayrıca dişi sıçanlarda anormal östrus döngülerine yol açtığı Swenerton ve Hurley tarafından kanıtlanmıştır (Swenerton ve Hurley 1968). Yine bu araştırmacıların iki maymun türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada, çinko eksikliğinde her iki türde de üremenin bozulduğu

bildirilmiştir. Gebelik oranlarında ise, çinko eksikliği oluşturulan maymunların adet döngülerinin kesilmesi nedeniyle orjinal stok koloni ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşüş bildirilmiştir (Swenerton ve Hurley 1980).

Çalışmamızda, serum GnRH ve LH seviyeleri gruplar arasında en düşük maternal çinko eksikliği oluşturulmuş devamında çinko eksik diyetle beslenen grup 1'de görülmüştür. En yüksek seviyelere ise, grup 3 ve grup 4'te rastlanmıştır. Bu bulgular sonucunda, maternal çinko eksikliğinde standart diyetin GnRH ve LH seviyelerini arttırdığı fakat kontrol değerlerine yaklaşması için ek çinko takviyesinin gerekli olduğu görülmüştür. Çalışmamızda saptanan, çinko eksiklikliğinin serumda GnRH ve LH hormon seviyelerini anlamlı olarak azaltması, çinkonun dişi üreme sistemi üzerine yapılan yukarıda bahsi geçen araştırma bulgularıyla tutarlılık göstermiştir.

Çalışmamızda, serum FSH düzeyleri grup 1'de ve grup 2'de, grup 3'e ve grup 4'e kıyasla önemli ölçüde düşük bulunmuştu. Bu bulgular ışığında, maternal çinko eksikliğinde yavrularda görülen azalan FSH düzeylerinin çinko takviyesiyle artıp kontrole yaklaştığı yorumu yapılabilir. Grup 1 ve grup 2 arasında anlamlı farklılık olmaması, maternal çinko eksikliği oluşturulan yavruların FSH seviyelerinin artması için standart diyetin yetersiz kaldığı kesinlik takviye çinko verilmesi gerektiğini göstermiştir.

4.3.3. Serum Leptin Bulgularının Tartışılması

167 amino asitlik bir peptit hormonu olan leptin, yağ dokusundan salgılanır (Kelesidis ve ark 2010). Leptin, anoreksijenik POMC nöronlarının ekspresyonunu aktive eder ve oreksijenik NPY/AgRP nöronlarının ekspresyonunu inhibe ederek iştah ve gıda alımında azalmaya neden olur (Schwartz ve ark 2000). Bunlara ek olarak, leptin üreme sistemi içinde kritik bir rol oynar (Sanchez-Garrido ve Tena-Sempere 2013). Leptin, hipotalamusun arkuat nükleusunda ve preoptik alanında leptin reseptörleri eksprese eden Kiss1 nöronlarının ekspresyonunu arttırır. Açlık ve kronik yetersiz beslenmenin hipotalamik Kiss1 mRNA'sını azalttığı ve sıçanlarda puberte başlangıcını geciktirdiği devamında yapılan merkezi kisspeptin uygulamasının ise üreme sistemine ait parametreleri restore ettiği gösterilmiştir (Castellano ve ark 2005). Leptin geni ob ve leptin reseptör geni ob-r'deki

mutasyonlar gıda alımı, obezite ve kısırlıkla sonuçlanmıştır (Friedman ve Halaas 1998).

Çinko, yağ metabolizması, adipokinler ve insülin gibi metabolik yolda önemli bir role sahiptir (Vallee ve Auld 1990, Vallee ve Falchuk 1993, Baltaci ve ark 2005). Çinko eksikliği, daha düşük serum adiponektin seviyeleri ile korelasyon gösterir (Mazloomi ve ark 2018). Çinko, moleküler düzeyde hem mRNA hem de protein seviyelerinde PPAR-Γ (peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptörler-gama) aktivasyonunu, sitokin üretimini (IL-2, TNF-α) (Kirchgessner ve ark 1997, Sarraf ve ark 1997, Yang ve ark 2002) ve hipotalamik leptin reseptörünün mRNA ekspresyonunu artırarak serum leptin ve adiponektin seviyelerini doğrudan etkiler.

Çalışmamızda, en yüksek serum leptin seviyeleri maternal çinko eksikliği oluşturulmuş devamında çinko takviyesi yapılan grup 3 ve grup 4'te tayin edilirken en düşük leptin seviyesi ise tüm gruplara oranla grup 1'de gözlemlendi. Bu bulgularımız bize gösterdi ki; çinko eksikliğinde azalan leptin seviyesi standart çinko diyetiyle restore edilebilir. Ayrıca standart diyetin yanına ek çinko takviyesiyle kontrol seviyelerine yaklaşabilir. Bulgularımız yukarda bahsi geçen araştırmalarla tutarlık göstermekte ve çinkonun bir adipokin olan leptin seviyelerini etkileyebileceğine dair kanıt sunmaktadır.

Maternal çinko eksikliği oluşturulmuş ve çinko eksik diyetle beslenen grup 1'de hem kisspeptin hem de leptin serum düzeylerinin en az olması, leptin hormonunun kisspeptini aktive ettiğini belirten çalışmalarla uyumlu bir sonuçtur. Fakat kisspeptinin serum seviyelerindeki değişiklikten esas olarak çinko eksikliğininin mi ve/veya leptin hormonunun eksikliğinin mi sorumlu olduğu gelecek çalışmalarda uygun gruplarla değendirilebilir.

4.3.4. Serum NPY Bulgularının Tartışılması

Çinko eksikliği, gıda alımında bir azalma ile sonuçlanır, bu da çinko durumunun normal gıda alımının altında yatan karmaşık mekanizmaları etkileyebileceğini düşündürür (Jing ve ark 2008). Zn eksikliği olan sıçanlarda gıda alımının baskılanma mekanizması hala araştırma konusudur. Mevcut çalışmalarda nöropeptitler ve hormonların beslenme davranışı ile ilgili olabileceği vurgulanmıştır

(Jing ve ark 2008). Yapılan bir çalışmada ise, çinko eksikliğinde NPY düzeyleri azalmış, takviyesi bu durumu tersine çevirmiştir (Baltaci ve Mogulkoc 2017).

NPY serum seviyesi, deney gruplarımız arasından en düşük grup 1 ve grup 2'te gözlemlendi. Bu iki grup arasındaki fark ise anlamlı değildi. Yani, maternal çinko eksikliği oluşturulmuş sıçanlarda uygulanan standart diyet, çinko eksikliğinde azalan NPY serum seviyelerini restore edememiştir. En yüksek serum NPY seviyesi ise çinko takviyesi yapılan grup 3'de idi. Bulgularımızın sonucu olarak, çinko takviyesinin NPY sekresyonunu uyardığını görmekteyiz. Ayrıca, grup 2 ve grup 4 arasında gözlemlenen anlamlı farklılık, iki gruptaki standart diyet koşulları gözönüne alındığında, maternal çinko eksikliğinin NPY serum seviyesini anlamlı bir şekilde azalttığını göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarımızı bir bütün olarak özetlemek gerekirse;

1) Hipotalamusta kisspeptin, GATAD1, NPY gen ekspresyon düzeyleri maternal çinko eksikliği oluşturulmuş gruplar arasından çinko eksik diyetle beslenen sıçanlarda anlamlı olarak azalmış, standart yem diyeti bu durumu değiştirememiştir. Fakat çinko takviyesiyle artmış, kontrole yaklaşmıştır.

2) Hipotalamusta GnRH gen ekspresyon düzeyi çinko eksikliği ile baskılanmış, çinko desteği bu durumu tersine çevirmiştir.

3) Serum kisspeptin, GnRH, LH, leptin seviyeleri çinko eksikliğinde önemli ölçüde azalırken çinko desteği bu hormonların seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır.

4) Serum FSH seviyeleri maternal çinko eksikliği oluşturulmuş sıçanlarda çinko eksikliğinde azalmış, standart yem diyeti ile anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Fakat çinko takviyesiyle anlamlı bir şekilde artmış, kontrole yaklaşmıştır.

5) NPY çinko takviyesinden önemli ölçüde etkilenmiş ve serumda seviyeleri artmıştır. Çinko eksikliğinin ise bu seviyeleri azalttığı görülmüştür.

6) Bu çalışmada, çinko eksikliğinden etkilenen, puberte için gerekli endokrin ve metabolik parametrelerin çinko desteği ile düzeltilebileceği gösterilmiştir.

7) Pre-natal ve post-natal çinko eksikliği arasındaki ayrımı daha net ortaya koyabilmek için, ilerleyen çalışmalarda farklı deney grupları oluşturularak karşılaştırma yapılabilir.

8) Pubertede görevli hormonların çinko tarafından uyarılma mekanizması halen araştırma konusudur. Bu yolaklarda görev alan proteinlerin gen ifade düzeyleri veya seviyeleri real-time PCR, western blot gibi teknikler ile belirlenebilir ve önemli bilgilere ulaşmamızı sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, 2013. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. New England Journal of Medicine, 368, 26, 2467-75.

Acuna-Goycolea C, Tamamaki N, Yanagawa Y, Obata K, van den Pol AN, 2005. Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. Journal of Neuroscience, 25, 32, 7406-19.

Ahima RS, 2005. Central actions of adipocyte hormones. Trends in Endocrinology & Metabolism, 16, 7, 307-13.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS, 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. Nature, 382, 6588, 250-2.

Ahmed ML, Ong KK, Morrell DJ, Cox L, Drayer N, Perry L, Preece MA, Dunger DB, 1999. Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84, 3, 899-905.

Amstalden M, Coolen L, Hemmerle A, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL, Lehman MN, 2010. Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: colocalisation in neurokinin B cells of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. Journal of neuroendocrinology, 22, 1, 1-12.

Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A, 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. Journal of proteome research, 5, 1, 196-201.

Ankarberg-Lindgren C, Dahlgren J, Carlsson B, Rosberg S, Carlsson L, Wikland KA, Norjavaara E, 2001. Leptin levels show diurnal variation throughout puberty in healthy children, and follow a gender-specific pattern. European journal of endocrinology, 145, 1, 43-51.

Argente J, Barrios V, Chowen J, Sinha M, Considine R, 1997. Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. The Journal of pediatrics, 131, 6, 833-8.

Bacopoulou F, Lambrou GI, Rodanaki M-E, Stergioti E, Efthymiou V, Deligeoroglou E, Markantonis SL, 2017. Serum kisspeptin concentrations are negatively correlated with body mass index in adolescents with anorexia nervosa and amenorrhea. Hormones, 16, 1, 33-41.

Baldock PA, Allison SJ, Lundberg P, Lee NJ, Slack K, Lin EJ, Enriquez RF, McDonald MM, Zhang L, During MJ, Little DG, Eisman JA, Gardiner EM, Yulyaningsih E, Lin S, Sainsbury A, Herzog H, 2007. Novel role of Y1 receptors in the coordinated regulation of bone and energy homeostasis. J Biol Chem, 282, 26, 19092-102.

Baltaci AK, Mogulkoc R, 2017. Leptin, NPY, melatonin and zinc levels in experimental hypothyroidism and hyperthyroidism: The relation to zinc. Biochemical genetics, 55, 3, 223-33.

Baltaci AK, Mogulkoc R, Halifeoglu I, 2005. Effects of zinc deficiency and supplementation on plasma leptin levels in rats. Biological trace element research, 104, 1, 41-6.

Baraban SC, 1998. Neuropeptide Y and limbic seizures. Reviews in the Neurosciences, 9, 2, 117-28.

Bedwal R, Bahuguna A, 1994. Zinc, copper and selenium in reproduction. Experientia, 50, 7, 626-40.

Bedwal R, Nair N, Mathur R, 1991. Effects of zinc deficiency and toxicity on reproductive organs, pregnancy and lactation: A review. Trace elements in medicine, 8, 2, 89-100.

Brothers SP, Wahlestedt C, 2010. Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands. EMBO molecular medicine, 2, 11, 429-39.

Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE, 2006. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. Journal of Comparative Neurology, 498, 5, 712-26.

Cao Y, Li Z, Jiang W, Ling Y, Kuang H, 2019. Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery. Reproductive Biology and Endocrinology, 17, 1, 1-9.

Cassandri M, Smirnov A, Novelli F, Pitolli C, Agostini M, Malewicz M, Melino G, Raschellà G, 2017. Zinc-finger proteins in health and disease. Cell death discovery, 3, 1, 1-12.

Castellano J, Navarro V, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez M, Vigo E, Casanueva F, Aguilar E, 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. Endocrinology, 146, 9, 3917-25.

Chehab FF, Lim ME, Lu R, 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Nature genetics, 12, 3, 318-20.

Chen MD, Lin PY, 2000. Zinc-induced hyperleptinemia relates to the amelioration of sucrose-induced obesity with zinc repletion. Obesity research, 8, 7, 525-9.

Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN, 2010. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. Endocrinology, 151, 1, 301-11.

Chesters J, Quarterman J, 1970. Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. British Journal of Nutrition, 24, 4, 1061-9.

Chesters J, Will M, 1973. Some factors controlling food intake by zinc-deficient rats. British Journal of Nutrition, 30, 3, 555-66.

Cholanian M, Krajewski-Hall SJ, Levine RB, McMullen NT, Rance NE, 2014. Electrophysiology of arcuate neurokinin B neurons in female Tac2-EGFP transgenic mice. Endocrinology, 155, 7, 2555-65.

Ciofi P, 2011. The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. Neuroscience letters, 487, 2, 187-90.

Clarke I, Cummins J, 1985. GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. Reproduction, 73, 2, 425-31.

Clarkson J, Han SY, Piet R, McLennan T, Kane GM, Ng J, Porteous RW, Kim JS, Colledge WH, Iremonger KJ, 2017. Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114, 47, E10216-E23.

Clarkson J, Herbison AE, 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology, 147, 12, 5817-25.

Colombini S, 1999. Canine zinc-responsive dermatosis. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 29, 6, 1373-83.

Colvin RA, Davis N, Nipper RW, Carter PA, 2000. Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. The Journal of nutrition, 130, 5, 1484S-7S.

Condomina J, Zornoza-Sabina T, Granero L, Polache A, 2002. Kinetics of zinc transport in vitro in rat small intestine and colon: interaction with copper. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 16, 4-5, 289-95.

Constantin S, Caligioni CS, Stojilkovic S, Wray S, 2009. Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. Endocrinology, 150, 3, 1400-12.

Cousins RJ, 1989. Theoretical and practical aspects of zinc uptake and absorption. mineral absorption in the monogastric GI tract, 3-12.

Cummings JE, Kovacic JP, 2009. The ubiquitous role of zinc in health and disease. Journal of veterinary emergency and critical care, 19, 3, 215-40.

de Croft S, Boehm U, Herbison AE, 2013. Neurokinin B activates arcuate kisspeptin neurons through multiple tachykinin receptors in the male mouse. Endocrinology, 154, 8, 2750-60.

de Croft S, Piet R, Mayer C, Mai O, Boehm U, Herbison AE, 2012. Spontaneous kisspeptin neuron firing in the adult mouse reveals marked sex and brain region differences but no support for a direct role in negative feedback. Endocrinology, 153, 11, 5384-93.

de Roux N, 2006. GnRH receptor and GPR54 inactivation in isolated gonadotropic deficiency. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 20, 4, 515-28.

DePasquale-Jardieu P, Fraker PJ, 1980. Further characterization of the role of corticosterone in the loss of humoral immunity in zinc-deficient A/J mice as determined by adrenalectomy. The Journal of Immunology, 124, 6, 2650-5.

Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo Y-M, Gitschier J, Eide D, Andrews GK, 2003. The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. Journal of Biological Chemistry, 278, 35, 33474-81.

Dutta S, Procaccino F, Aamodt R, 1998. Zinc metabolism in patients with exocrine pancreatic insufficiency. Journal of the American College of Nutrition, 17, 6, 556-63.

Ebisch I, Thomas C, Peters W, Braat D, Steegers-Theunissen R, 2007. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. Human reproduction update, 13, 2, 163-74.

Ekblad E, Sundler F, 2002. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. Peptides, 23, 2, 251-61.

Ellacott KL, Cone RD, 2004. The central melanocortin system and the integration of short-and long-term regulators of energy homeostasis. Recent progress in hormone research, 59, 1, 395-408.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S, 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. New England journal of medicine, 341, 12, 879-84.

Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. New England Journal of Medicine, 356, 3, 237-47.

Favier AE, 1992. Hormonal effects of zinc on growth in children. Biological trace element research, 32, 1, 383-98.

Ferguson EL, Gibson RS, Thompson LU, Ounpuu S, 1989. Dietary calcium, phytate, and zinc intakes and the calcium, phytate, and zinc molar ratios of the diets of a selected group of East African children. The American journal of clinical nutrition, 50, 6, 1450-6.

Fischbein S, 1977. Intra-pair similarity in physical growth of monozygotic and of dizygotic twins during puberty. Annals of Human Biology, 4, 5, 417-30.

Foster M, Samman S, 2012. Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. Nutrients, 4, 7, 676-94.

Fraker P, 1979. The role of corticosterone in the loss in immune function in the zinc-deficient a/j mouse.

Frederickson CJ, Hershfinkel M, Giblin LJ, 2005. The Gluzinergic Synapse: Who's Talking and Who's Listening? In: Synaptic Plasticity and Transsynaptic Signaling. Eds: Springer, p. 123-37.

Friedman JM, Halaas JL, 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature, 395, 6704, 763-70.

Fu L-Y, van den Pol AN, 2010. Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. Journal of Neuroscience, 30, 30, 10205-19.

Fukada T, Kambe T, 2011. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. Metallomics, 3, 7, 662-74.

Gajdos ZK, Butler JL, Henderson KD, He C, Supelak PJ, Egyud M, Price A, Reich D, Clayton PE, Le Marchand L, 2008. Association studies of common variants in 10 hypogonadotropic

hypogonadism genes with age at menarche. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93, 11, 4290-8.

García OP, Long KZ, Rosado JL, 2009. Impact of micronutrient deficiencies on obesity. Nutrition reviews, 67, 10, 559-72.

Gaskins GT, Glanowska KM, Moenter SM, 2013. Activation of neurokinin 3 receptors stimulates GnRH release in a location-dependent but kisspeptin-independent manner in adult mice. Endocrinology, 154, 11, 3984-9.

Gibson RS, Ferguson E, 1998. Assessment of dietary zinc in a population. The American journal of clinical nutrition, 68, 2, 430S-4S.

Goodman RL, Coolen LM, Anderson GM, Hardy SL, Valent M, Connors JM, Fitzgerald ME, Lehman MN, 2004. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. Endocrinology, 145, 6, 2959-67.

Goodman RL, Hileman SM, Nestor CC, Porter KL, Connors JM, Hardy SL, Millar RP, Cernea M, Coolen LM, Lehman MN, 2013. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. Endocrinology, 154, 11, 4259-69.

Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, De Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. Endocrinology, 148, 12, 5752-60.

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

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA, 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology, 145, 9, 4073-7.

Grachev P, Li X, Kinsey-Jones J, Di Domenico A, Millar RP, Lightman SL, O'Byrne KT, 2012. Suppression of the GnRH pulse generator by neurokinin B involves a κ-opioid receptor-dependent mechanism. Endocrinology, 153, 10, 4894-904.

Gründker C, Völker P, Emons Gn, 2001. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G proteinα I-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. Endocrinology, 142, 6, 2369-80.

Gueorguiev M, Góth MI, Korbonits M, 2001. Leptin and puberty: a review. Pituitary, 4, 1, 79-86.

Guo L, Lichten LA, Ryu M-S, Liuzzi JP, Wang F, Cousins RJ, 2010. STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 7, 2818-23.

Hafiez A, El-Kirdassy Z, Mansour M, Sharada H, El-Zayat E, 1989. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 1. Effect of dietary zinc deficiency on serum levels of gonadotropins, prolactin and testosterone in male albino rats. Food/Nahrung, 33, 10, 935-40.

Hagen CP, Sørensen K, Mieritz MG, Johannsen TH, Almstrup K, Juul A, 2015. Circulating MKRN3 levels decline prior to pubertal onset and through puberty: a longitudinal study of healthy girls. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 100, 5, 1920-6.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW, 1998. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. Nature neuroscience, 1, 4, 271-2.

Hamdi S, Nassif O, Ardawi M, 1997. Effect of marginal or severe dietary zinc deficiency on testicular development and functions of the rat. Archives of andrology, 38, 3, 243-53.

Hameed S, Jayasena CN, Dhillo WS, 2011. Kisspeptin and fertility. Journal of Endocrinology, 208, 2, 97.

Han S-K, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Herbison AE, 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. Journal of Neuroscience, 25, 49, 11349-56.

Herbison A, Theodosis D, 1992. Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. Neuroscience, 50, 2, 283-98.

Herbison AE, d'Anglemont de Tassigny X, Doran J, Colledge WH, 2010. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology, 151, 1, 312-21.

Hess SY, King JC, 2009. Effects of maternal zinc supplementation on pregnancy and lactation outcomes. Food and nutrition bulletin, 30, 1_suppl1, S60-S78.

Higo S, Iijima N, Ozawa H, 2017. Characterisation of Kiss1r (Gpr54)-expressing neurones in the arcuate nucleus of the female rat hypothalamus. Journal of neuroendocrinology, 29, 2.

Hotz C, Peerson JM, Brown KH, 2003. Suggested lower cutoffs of serum zinc concentrations for assessing zinc status: reanalysis of the second National Health and Nutrition Examination Survey data (1976–1980). The American journal of clinical nutrition, 78, 4, 756-64.

Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath M, Keller E, Caraty A, Bloom S, Ghatei M, Dhillo W, Liposits Z, 2010. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. European Journal of Neuroscience, 31, 11, 1984-98.

Hurley LS, Swenert'on H, 1966. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 123, 3, 692-6.

Izzi-Engbeaya C, Comninos AN, Clarke SA, Jomard A, Yang L, Jones S, Abbara A, Narayanaswamy S, Eng PC, Papadopoulou D, 2018. The effects of kisspeptin on β-cell function, serum metabolites and appetite in humans. Diabetes, Obesity and Metabolism, 20, 12, 2800-10.

Jeong J, Eide DJ, 2013. The SLC39 family of zinc transporters. Molecular aspects of medicine, 34, 2-3, 612-9.

Jin L, Burguera BG, Couce ME, Scheithauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV, 1999. Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84, 8, 2903-11.

Jing M-Y, Sun J-Y, Wang J-F, 2008. The effect of peripheral administration of zinc on food intake in rats fed Zn-adequate or Zn-deficient diets. Biological trace element research, 124, 2, 144-56.

Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD, 1999. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. Human molecular genetics, 8, 5, 783-93.

Kalamatianos T, Grimshaw S, Poorun R, Hahn J, Coen C, 2008. Fasting reduces KiSS-1 expression in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV): effects of fasting on the expression of KiSS-1 and neuropeptide Y in the AVPV or arcuate nucleus of female rats. Journal of neuroendocrinology, 20, 9, 1089-97.

Kambe T, Andrews GK, 2009. Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. Molecular and cellular biology, 29, 1, 129-39.

Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N, 2015. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. Physiological reviews.

Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M, 2004. Overview of mammalian zinc transporters. Cellular and molecular life sciences CMLS, 61, 1, 49-68.

Kaprio J, Rimpelä A, Winter T, Viken RJ, Rimpelä M, Rose RJ, 1995. Common genetic influences on BMI and age at menarche. Human biology, 739-53.

Kaswan S, Bedwal R, 1995. Light and electron microscopic changes in the ovary of zinc deficient BALB/c mice. Indian Journal of Experimental Biology, 33, 7, 469-79.

Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS, 2010. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. Annals of internal medicine, 152, 2, 93-100.

Kennedy G, Mitra J, 1963. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. The Journal of physiology, 166, 2, 408.

Kienholz E, Turk D, Sunde M, Hoekstra W, 1961. Effects of zinc deficiency in the diets of hens. Journal of Nutrition, 75, 211-21.

Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, Ahn RW, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran TV, 2011. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. ACS chemical biology, 6, 7, 716-23.

Kim AM, Vogt S, O'halloran TV, Woodruff TK, 2010. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. Nature chemical biology, 6, 9, 674-81.

Kim B-E, Wang F, Dufner-Beattie J, Andrews GK, Eide DJ, Petris MJ, 2004. Zn2+-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane. Journal of Biological Chemistry, 279, 6, 4523-30.

Kimura T, Kambe T, 2016. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: an overview and perspective. International Journal of Molecular Sciences, 17, 3, 336.

King JC, Shames DM, Woodhouse LR, 2000. Zinc homeostasis in humans. The Journal of nutrition, 130, 5, 1360S-6S.

King L, Osati-Ashtiani F, Fraker P, 2002. Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursor lymphocytes during zinc deficiency in mice. The Journal of nutrition, 132, 5, 974-9.

Kinsey-Jones JS, Grachev P, Li XF, Lin YS, Milligan SR, Lightman SL, O'Byrne KT, 2012. The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. Endocrinology, 153, 1, 307-15.

Kirchgessner TG, Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS, 1997. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. The Journal of clinical investigation, 100, 11, 2777-82.

Kirilov M, Clarkson J, Liu X, Roa J, Campos P, Porteous R, Schütz G, Herbison AE, 2013. Dependence of fertility on kisspeptin–Gpr54 signaling at the GnRH neuron. Nature communications, 4, 1, 1-11.

Koerner A, Kratzsch J, Kiess W, 2005. Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversical, adiponectin—the promising, and more to come. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 19, 4, 525-46.

Kohno D, Yada T, 2012. Arcuate NPY neurons sense and integrate peripheral metabolic signals to control feeding. Neuropeptides, 46, 6, 315-9.

Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro J, 1996. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 11, 4162-5.

Komai M, Goto T, Ohinata K, Kambe T, Mayanagi Y, Shirakawa H, 2018. Clarification of the mechanism involved in orexigenic action by oral zinc ingestion. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 138, 8, 1011-6.

Kong BY, Bernhardt ML, Kim AM, O'Halloran TV, Woodruff TK, 2012. Zinc maintains prophase I arrest in mouse oocytes through regulation of the MOS-MAPK pathway. Biology of reproduction, 87, 1, 11, 1-2.

Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden J-M, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. Journal of Biological Chemistry, 276, 37, 34631-6.

Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE, 2005. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. Journal of Comparative Neurology, 489, 3, 372-86.

Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, Seidel B, Mueller G, Thiery J, Hebebrand J, Kiess W, 2002. Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 87, 10, 4587-94.

Laity JH, Lee BM, Wright PE, 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. Current opinion in structural biology, 11, 1, 39-46.

Latif R, Rafique N, 2015. Serum kisspeptin levels across different phases of the menstrual cycle and their correlation with serum oestradiol. Neth J Med, 73, 4, 175-8.

Lebrethon M-C, Vandersmissen E, Gerard A, Parent A-S, Junien J, Bourguignon J-P, 2000. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. Endocrinology, 141, 4, 1464-9.

Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, Coulombe N, Tan CP, Tang-Nguyen A-T, George SR, 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. FEBS letters, 446, 1, 103-7.

Lee J-H, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR, 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 88, 23, 1731-7.

Lee RG, Rains TM, Tovar-Palacio C, Beverly JL, Shay NF, 1998. Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y–induced feeding in rats. The Journal of nutrition, 128, 7, 1218-23.

Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL, 2010. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology, 151, 8, 3479-89.

Lichten LA, Cousins RJ, 2009. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. Annual review of nutrition, 29, 153-76.

Lin S, Boey D, Couzens M, Lee N, Sainsbury A, Herzog H, 2005. Compensatory changes in [125I]-PYY binding in Y receptor knockout mice suggest the potential existence of further Y receptor (s). Neuropeptides, 39, 1, 21-8.

Lin S, Boey D, Herzog H, 2004. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. Neuropeptides, 38, 4, 189-200.

Liu X, Herbison A, 2015. Kisspeptin regulation of arcuate neuron excitability in kisspeptin receptor knockout mice. Endocrinology, 156, 5, 1815-27.

Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ, 2004. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 40, 14355-60.

Liuzzi JP, Cousins RJ, 2004. Mammalian zinc transporters. Annu. Rev. Nutr., 24, 151-72.

Logas D, Kunkle GA, McDowell L, 1993. Comparison of serum zinc levels in healthy, systemically ill and dermatologically diseased dogs. Veterinary dermatology, 4, 2, 61-4.

Loh K, Herzog H, Shi Y-C, 2015. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. Trends in Endocrinology & Metabolism, 26, 3, 125-35.

Lomniczi A, Wright H, Castellano JM, Matagne V, Toro CA, Ramaswamy S, Plant TM, Ojeda SR, 2015. Epigenetic regulation of puberty via Zinc finger protein-mediated transcriptional repression. Nature communications, 6, 1, 1-16.

Lonnerdal B, 2000. Dietary factors influencing zinc absorption. The Journal of nutrition, 130, 5, 1378S-83S.

Lowe JA, Wiseman J, 1998. A comparison of the bioavailability of three dietary zinc sources using four different physiologic parameters in dogs. The Journal of nutrition, 128, 12, 2809S-11S.

Lucas L, Hurley D, Krause J, Harlan R, 1992. Localization of the tachykinin neurokinin B precursor peptide in rat brain by immunocytochemistry and in situ hybridization. Neuroscience, 51, 2, 317-45.

MacDonald RS, 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. The Journal of nutrition, 130, 5, 1500S-8S.

Maffei á, Halaas J, Ravussin E, Pratley R, Lee G, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nature medicine, 1, 11, 1155-61.

Mangian HF, Lee RG, Paul GL, Emmert JL, Shay NF, 1998. Zinc deficiency suppresses plasma leptin concentrations in rats. The Journal of Nutritional Biochemistry, 9, 1, 47-51.

Mao X, Kim B-E, Wang F, Eide DJ, Petris MJ, 2007. A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. Journal of Biological Chemistry, 282, 10, 6992-7000.

Maret W, (2013). Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Vol. 13, Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Maret W, Sandstead HH, 2008. Possible roles of zinc nutriture in the fetal origins of disease. Experimental Gerontology, 43, 5, 378-81.

Marreiro DdN, Geloneze B, Tambascia MA, Lerário AC, Halpern A, Cozzolino SMF, 2006. Effect of zinc supplementation on serum leptin levels and insulin resistance of obese women. Biological trace element research, 112, 2, 109-18.

Martin G, White C, Markey C, Blackberry M, 1994. Effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and the secretion of inhibin and testosterone. Reproduction, 101, 1, 87-96.

Martos-Moreno GA, Barrios V, Argente J, 2006. Normative data for adiponectin, resistin, interleukin 6, and leptin/receptor ratio in a healthy Spanish pediatric population: relationship with sex steroids. European journal of endocrinology, 155, 3, 429-34.

Martos-Moreno GÁ, Barrios V, Martínez G, Hawkins F, Argente J, 2010. Effect of weight loss on high-molecular weight adiponectin in obese children. Obesity, 18, 12, 2288-94.

Maxfield L, Crane JS, 2020. Zinc deficiency. StatPearls [Internet].

Maxwell C, Volpe SL, 2007. Effect of zinc supplementation on thyroid hormone function. Annals of Nutrition and Metabolism, 51, 2, 188-94.

Mazloomi S, Alizadeh N, Aminzare M, Niroomand S, Mousavi SN, 2018. Retracted article: serum zinc and adiponectin levels in patients with polycystic ovary syndrome, adjusted for anthropometric, biochemical, dietary intake, and physical activity measures. Biological trace element research, 181, 2, 388-.

McDevitt MA, Glidewell-Kenney C, Jimenez MA, Ahearn PC, Weiss J, Jameson JL, Levine JE, 2008. New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. Molecular and cellular endocrinology, 290, 1-2, 24-30.

Protein of the Month, 2007. Zinc Fingers. Erişim. Erişim adresi, http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2007_3/Page1.htm.

Meier U, Gressner AM, 2004. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. Clinical chemistry, 50, 9, 1511-25.

Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, 5, 1761-6.

Millar RP, 2005. GnRHs and GnRH receptors. Animal reproduction science, 88, 1-2, 5-28.

Milne D, Canfield W, Mahalko J, Sandstead H, 1984. Effect of oral folic acid supplements on zinc, copper, and iron absorption and excretion. The American journal of clinical nutrition, 39, 4, 535-9.

Min L, Soltis K, Reis ACS, Xu S, Kuohung W, Jain M, Carroll RS, Kaiser UB, 2014. Dynamic kisspeptin receptor trafficking modulates kisspeptin-mediated calcium signaling. Molecular endocrinology, 28, 1, 16-27.

Mitchell V, Prevot V, Jennes L, Aubert J-P, Croix D, Beauvillain J-C, 1997. Presence of μ and κ opioid receptor mRNAs in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. Neuroreport, 8, 14, 3167-72.

Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. Journal of Biological Chemistry, 276, 31, 28969-75.

Müller F, Terblanche J, Schall R, van Zyl Smit R, Tucker T, Marais K, Groenewoud G, Porchet H, Weiner M, Hawarden D, 1997. Pharmacokinetics of triptorelin after intravenous bolus administration in healthy males and in males with renal or hepatic insufficiency. British journal of clinical pharmacology, 44, 4, 335-41.

Navarro VM, Bosch MA, León S, Simavli S, True C, Pinilla L, Carroll RS, Seminara SB, Tena-Sempere M, Rønnekleiv OK, 2015. The integrated hypothalamic tachykinin-kisspeptin system as a central coordinator for reproduction. Endocrinology, 156, 2, 627-37.

Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA, 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. Journal of Neuroscience, 29, 38, 11859-66.

Nishito Y, Kambe T, 2019. Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. Journal of Biological Chemistry, 294, 43, 15686-97.

O'Dell B, Reeves P, 1989. Zinc status and food intake. In: Zinc in human biology. Eds: Springer, p. 173-81.

Oberleas D, Muhrer ME, O'Dell BL, 1966. Dietary metal-complexing agents and zinc availability in the rat. The Journal of Nutrition, 90, 1, 56-62.

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. Nature, 411, 6837, 613-7.

Ojeda SR, Lomniczi A, 2014. Unravelling the mystery of puberty. Nature Reviews Endocrinology, 10, 2, 67-9.

Orlowski M, Michaud C, Chu TG, 1983. A soluble metalloendopeptidase from rat brain: purification of the enzyme and determination of specificity with synthetic and natural peptides. European journal of biochemistry, 135, 1, 81-8.

Palmert MR, Boepple PA, 2001. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 86, 6, 2364-8.

Palmiter RD, 2004. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 14, 4918-23.

Palmiter RD, Huang L, 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. Pflügers Archiv, 447, 5, 744-51.

Pan H, Li N, Wu Q, 2016. The changes of serum leptin and kisspeptin levels in Chinese children and adolescents in different pubertal stages. International journal of endocrinology, 2016.

Parent A-S, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon J-P, 2003. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocrine reviews, 24, 5, 668-93.

Perry JR, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, Smith AV, Aspelund T, Bandinelli S, Boerwinkle E, 2009. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. Nature genetics, 41, 6, 648-50.

Plant TM, Shahab M, 2002. Neuroendocrine mechanisms that delay and initiate puberty in higher primates. Physiology & behavior, 77, 4-5, 717-22.

Prasad AS, 1991. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. The American journal of clinical nutrition, 53, 2, 403-12.

Prasad AS, 2000. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. The Journal of infectious diseases, 182, Supplement_1, S62-S8.

Prasad AS, 2008. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. Molecular medicine, 14, 5, 353-7.

Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M, 1961. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. The American journal of medicine, 31, 4, 532-46.

Prasad AS, Kucuk O, 2002. Zinc in cancer prevention. Cancer and metastasis Reviews, 21, 3, 291-5.

Quinton N, Smith R, Clayton PE, Gill M, Shalet S, Justice S, Simon S, Walters S, Postel-Vinay M-C, Blakemore A, 1999. Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84, 7, 2336-41.

Ramakrishnappa N, Rajamahendran R, Lin Y-M, Leung P, 2005. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. Animal reproduction science, 88, 1-2, 95-113.

Ramaswamy S, Guerriero KA, Gibbs RB, Plant TM, 2008. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (Macaca mulatta) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. Endocrinology, 149, 9, 4387-95.

Rink L, 2000. Zinc and the immune system. Proceedings of the Nutrition Society, 59, 4, 541-52.

Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M, 2010. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. Peptides, 31, 4, 757-76.

Rogers JM, Keen CL, Hurley LS, 1985. Zinc deficiency in pregnant Long-Evans hooded rats: Teratogenicity and tissue trace elements. Teratology, 31, 1, 89-100.

Rometo AM, Krajewski SJ, Lou Voytko M, Rance NE, 2007. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 92, 7, 2744-50.

Rønnekleiv OK, Kelly MJ, 2013. Kisspeptin excitation of GnRH neurons. Kisspeptin signaling in reproductive biology, 113-31.

Rosenzweig AC, 2002. Metallochaperones: bind and deliver. Chemistry & biology, 9, 6, 673-7.

Roth HP, Kirchgessner M, 1985. Utilization of zinc from picolinic or citric acid complexes in relation to dietary protein source in rats. The Journal of nutrition, 115, 12, 1641-9.

Ruka KA, Burger LL, Moenter SM, 2013. Regulation of arcuate neurons coexpressing kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin by modulators of neurokinin 3 and κ-opioid receptors in adult male mice. Endocrinology, 154, 8, 2761-71.

Russell R, Beard JL, Cousins RJ, Dunn JT, Ferland G, Hambidge K, Lynch S, Penland J, Ross A, Stoecker B, 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. A Report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board Institute of Medicine.

Sainsbury A, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B, 1997. Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats. Diabetes, 46, 2, 209-14.

Sainsbury A, Zhang L, 2010. Role of the arcuate nucleus of the hypothalamus in regulation of body weight during energy deficit. Molecular and cellular endocrinology, 316, 2, 109-19.

Salgueiro MJ, Zubillaga MB, Lysionek AE, Caro RA, Weill R, Boccio JR, 2002. The role of zinc in the growth and development of children. Nutrition, 18, 6, 510-9.

Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M, 2013. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. Hormones and behavior, 64, 2, 187-94.

Sandstead HH, 2000. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. The Journal of nutrition, 130, 2, 347S-9S.

Sandstead HH, Frederickson CJ, Penland JG, 2000. History of zinc as related to brain function. The Journal of nutrition, 130, 2, 496S-502S.

Sandstead HH, Smith Jr JC, 1996. Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. The Journal of nutrition, 126, suppl_9, 2410S-8S.

Sandström B, Lönnerdal B, 1989. Promoters and antagonists of zinc absorption. In: Zinc in human biology. Eds: Springer, p. 57-78.

Sannella M, Petersen S, 1997. Dual label in situ hybridization studies provide evidence that luteinizing hormone-releasing hormone neurons do not synthesize messenger ribonucleic acid for μ, κ, or δ opiate receptors. Endocrinology, 138, 4, 1667-72.

Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet III DJ, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR, 1997. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. The Journal of experimental medicine, 185, 1, 171-6.

Schütz B, SCHÄFER MH, Eiden L, Weihe E, 1998. VIP and NPY Expression during Differentiation of Cholinergic and Noradrenergic Sympathetic Neurons a. Annals of the New York Academy of Sciences, 865, 1, 537-41.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG, 2000. Central nervous system control of food intake. Nature, 404, 6778, 661-71.

Selvais PL, Labuche C, Ninh NX, Ketelslegers JM, Denef JF, Maiter DM, 1997. Cyclic feeding behaviour and changes in hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression induced by zinc deficiency in the rat. Journal of neuroendocrinology, 9, 1, 55-62.

Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A, 2014. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 99, 4, E647-E51.

Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM, 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, 6, 2129-34.

Shaver SW, Pang JJ, Wainman DS, Wall KM, Gross PM, 1992. Morphology and function of capillary networks in subregions of the rat tuber cinereum. Cell and tissue research, 267, 3, 437-48.

Shaw NA, Dickey H, Brugman H, Blamberg D, Witter J, 1974. Zinc deficiency in female rabbits. Laboratory animals, 8, 1, 1-7.

Simmer K, Iles C, James C, Thompson R, 1987. Are iron-folate supplements harmful? The American journal of clinical nutrition, 45, 1, 122-5.

Sitticharoon C, Boonpuan V, Mitrpant C, Churintaraphan M, 2013. Determination of KISS1, KISS1R and Kisspeptin in fat tissue of normal weight and obese humans and correlations between Serum Kisspeptin and leptin. Siriraj Medical Journal, 65, 4, 112-6.

Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA, 2006. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. Journal of neuroendocrinology, 18, 4, 298-303.

Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, Bateman K, Goodman RL, Tilbrook AJ, Ubuka T, 2008. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. Endocrinology, 149, 11, 5770-82.

Smith JT, Li Q, Yap KS, Shahab M, Roseweir AK, Millar RP, Clarke IJ, 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. Endocrinology, 152, 3, 1001-12.

Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA, 2006. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. Journal of Neuroscience, 26, 25, 6687-94.

Sobrino V, Soledad M, Perdices-López C, Jimenez-Puyer M, Tena-Sempere M, 2022. Kisspeptins and the Neuroendocrine Control of Reproduction: Recent Progress and New Frontiers in Kisspeptin Research. Frontiers in neuroendocrinology, 100977.

Soliman A, De Sanctis V, Elalaily R, 2014. Nutrition and pubertal development. Indian journal of endocrinology and metabolism, 18, Suppl 1, S39.

Solomons NW, 1986. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: consequences for human nutrition. The Journal of nutrition, 116, 6, 927-35.

Sone M, Osamura RY, 2001. Leptin and the pituitary. Pituitary, 4, 1, 15-23.

Spahl DU, Berendji-Grün D, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, Kröncke K-D, 2003. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn2+ release. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 24, 13952-7.

Strachan S, 2010. Trace elements. Current Anaesthesia & Critical Care, 21, 1, 44-8.

Suzuki H, Asakawa A, B Li J, Tsai M, Amitani H, Ohinata K, Komai M, Inui A, 2011. Zinc as an appetite stimulator-the possible role of zinc in the progression of diseases such as cachexia and sarcopenia. Recent patents on food, nutrition & agriculture, 3, 3, 226-31.

Swenerton H, Hurley LS, 1968. Severe zinc deficiency in male and female rats. The Journal of nutrition, 95, 1, 8-18.

Swenerton H, Hurley LS, 1980. Zinc deficiency in rhesus and bonnet monkeys, including effects on reproduction. The Journal of Nutrition, 110, 3, 575-83.

Takeda A, 2001. Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. Biometals, 14, 3, 343-51.

Tena-Sempere M, Pinilla L, Zhang F-P, González LC, Huhtaniemi I, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, 2001. Developmental and hormonal regulation of leptin receptor (Ob-R) messenger ribonucleic acid expression in rat testis. Biology of reproduction, 64, 2, 634-43.

Tiong JD, Pakiam JG, Wray S, 2004. Gonadotropin releasing hormone-1 expression in incisors of mice. Endocrinology, 145, 8, 3608-12.

Todd WR, Elvehjem C, Hart E, 1933. Zinc in the nutrition of the rat. American Journal of Physiology-Legacy Content, 107, 1, 146-56.

Tomat AL, Inserra F, Veiras L, Vallone MC, Balaszczuk AM, Costa MA, Arranz C, 2008. Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 295, 2, R543-R9.

Towne B, Czerwinski SA, Demerath EW, Blangero J, Roche AF, Siervogel RM, 2005. Heritability of age at menarche in girls from the Fels Longitudinal Study. American journal of physical anthropology, 128, 1, 210-9.

Tuerk MJ, Fazel N, 2009. Zinc deficiency. Current opinion in gastroenterology, 25, 2, 136-43.

Tullai JW, Cummins PM, Pabon A, Roberts JL, Lopingco MC, Shrimpton CN, Smith AI, Martignetti JA, Ferro ES, Glucksman MJ, 2000. The neuropeptide processing enzyme EC 3.4. 24.15 is modulated by protein kinase A phosphorylation. Journal of Biological Chemistry, 275, 47, 36514-22.

Turk D, Sunde M, Hoekstra W. Zinc deficiency experiments with poultry. Poultry Science, 1256-.

Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa M, Okamura H, Maeda KI, 2011. Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone

(GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. Journal of neuroendocrinology, 23, 10, 863-70.

Ugarte M, Osborne NN, Brown LA, Bishop PN, 2013. Iron, zinc, and copper in retinal physiology and disease. Survey of ophthalmology, 58, 6, 585-609.

Vallee BL, 1995. The function of metallothionein. Neurochemistry international, 27, 1, 23-33.

Vallee BL, Auld DS, 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry, 29, 24, 5647-59.

Vallee BL, Falchuk KH, 1993. The biochemical basis of zinc physiology. Physiological reviews, 73, 1, 79-118.

van den Berg SM, Boomsma DI, 2007. The familial clustering of age at menarche in extended twin families. Behavior genetics, 37, 5, 661-7.

von Bülow V, Rink L, Haase H, 2005. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF-α and IL-1β production in monocytes by elevation of guanosine 3′, 5′-cyclic monophosphate. The Journal of Immunology, 175, 7, 4697-705.

Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K-I, 2010. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. Journal of Neuroscience, 30, 8, 3124-32.

Wang F, Kim B-E, Dufner-Beattie J, Petris MJ, Andrews G, Eide DJ, 2004. Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. Human molecular genetics, 13, 5, 563-71.

Wang H, Hu Y-F, Hao J-H, Chen Y-H, Su P-Y, Wang Y, Yu Z, Fu L, Xu Y-Y, Zhang C, 2015. Maternal zinc deficiency during pregnancy elevates the risks of fetal growth restriction: a population-based birth cohort study. Scientific reports, 5, 1, 1-10.

Wang X, Zhou B, 2010. Dietary zinc absorption: A play of Zips and ZnTs in the gut. IUBMB life, 62, 3, 176-82.

Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, Andrews GK, 2007. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5).

Weems PW, Witty CF, Amstalden M, Coolen LM, Goodman RL, Lehman MN, 2016. κ-Opioid receptor is colocalized in GnRH and KNDy cells in the female ovine and rat brain. Endocrinology, 157, 6, 2367-79.

West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE, 1998. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). Genomics, 54, 1, 145-8.

Whisnant C, Goodman R, 1988. Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. Biology of reproduction, 39, 5, 1032-8.

Williams R, Mills CF, 1970. The experimental production of zinc deficiency in the rat. British Journal of Nutrition, 24, 4, 989-1003.

Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP, 2000. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. Fertility and sterility, 73, 3, 435-42.

Woodhouse L, Lowe N, Randolph J, Sutherland B, Turnlund J, Jackson M, King J. Zinc homeostasis during dietary zinc depletion and repletion in humans. FASEB JOURNAL, 1128-.

Woods SC, D'Alessio DA, 2008. Central control of body weight and appetite. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93, 11_supplement_1, s37-s50.

Xin X, Li Z, Zhong Y, Li Q, Wang J, Zhang H, Yuan X, Li J, Zhang Z, 2019. KISS1 suppresses apoptosis and stimulates the synthesis of E2 in porcine ovarian granulosa cells. Animals, 9, 2, 54.

Xu J, Kirigiti MA, Grove KL, Smith MS, 2009. Regulation of food intake and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone during lactation: role of insulin and leptin. Endocrinology, 150, 9, 4231-40.

Yamamura T, Wakabayashi Y, Ohkura S, Navarro VM, Okamura H, 2014. Effects of intravenous administration of neurokinin receptor subtype-selective agonists on gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and luteinizing hormone secretion in goats. Journal of Reproduction and Development.

Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E, 2008. Zinc deficiency alters DNA damage response genes in normal human prostate epithelial cells. The Journal of nutrition, 138, 4, 667-73.

Yang W-S, Jeng C-Y, Wu T-J, Tanaka S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Wang J-P, Chen C-L, Tai T-Y, Chuang L-M, 2002. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. Diabetes care, 25, 2, 376-80.

Yu W, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann S, 1997. Role of leptin in hypothalamic–pituitary function. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94, 3, 1023-8.

Zacharias L, Wurtman RJ, 1969. Age at menarche. N Engl J Med, 280, 16, 868-75.

Zhang C, Roepke TA, Kelly MJ, Rønnekleiv OK, 2008. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. Journal of Neuroscience, 28, 17, 4423-34.

EK-B: Turnitin Raporu

MATERNAL ÇİNKO EKSİKLİĞİ OLUŞTURULMUŞ DİŞİ SIÇANLARDA ÇİNKO EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN PUBERTAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Yazar Buse Günaydın

Gönderim Tarihi: 09-May-2022 03:49PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1832008214
Dosya adı: NKO_EKS_KL_VE_DESTE_N_N_PUBERTAL_PARAMETRELER_ZER_NE_ETK_S.docx (836.76K)
Kelime sayısı: 13491
Karakter sayısı: 93320

MATERNAL ÇİNKO EKSİKLİĞİ OLUŞTURULMUŞ DİŞİ SIÇANLARDA ÇİNKO EKSİKLİĞİ VE DESTEĞİNİN PUBERTAL PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%3	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
2	iksadyayinevi.com İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	%1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
7	9lib.net İnternet Kaynağı	<%1
8	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

acikerisim.selcuk.edu.tr:8080