



**ERKEK SIÇANLARA  
İNTRASEREBROVENTRİKÜLER ASPROSİN  
UYGULAMASININ ÜREME HORMONLARI  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tuba KESKİN**

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Suat TEKİN**

**Yüksek Lisans Tezi – 2021**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERKEK SIÇANLARA İNTRASEREBROVENTRİKÜLER ASPROSİN  
UYGULAMASININ ÜREME HORMONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tuba KESKİN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Suat TEKİN**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TYL-2020-2185 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA  
2021**

# İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| ÖZET .....  | vi   |
| ABSTRACT.....   | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....  | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....   | ix   |
| TABLolar DİZİNİ.....  | xi   |
| 1. GİRİŞ .....  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....   | 3    |
| 2.1. Asprosin .....   | 3    |
| 2.1.1. Keşfi ve İsimlendirilmesi.....                                       | 3    |
| 2.1.2. Biyokimyasal Yapısı ve Lokalizasyonu .....                           | 3    |
| 2.1.3. Reseptörü .....  | 4    |
| 2.1.4. Etki Mekanizması .....   | 5    |
| 2.1.5. Fizyolojik Rollerini.....  | 5    |
| 2.2. Hipotalamus .....  | 10   |
| 2.2.1. Hipotalamusun Fonksiyonları ve Hipotalamik Nükleuslar .....          | 11   |
| 2.2.2. Hipotalamustan GnRH Salgılanması .....                               | 13   |
| 2.3. Hipofiz .....  | 14   |
| 2.3.1. Hipofiz Bezinin Fonksiyonları.....                                   | 14   |
| 2.3.2. Hipofiz Bezinden LH ve FSH Salgılanması .....                        | 15   |
| 2.4. Testiküler Fonksiyonlar ve Spermatogenez.....                          | 16   |
| 2.4.1. Testis ve Epididimisin Yapısı .....                                  | 16   |
| 2.4.2. Testis ve Epididimisin Fonksiyonları .....                           | 17   |
| 2.4.3. Leydig Hücrelerinden Testosteron Salgılanması .....                  | 17   |
| 2.4.4. Spermatogenez.....   | 18   |
| 2.5. Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks .....                               | 20   |
| 3. MATERYAL VE METOT .....  | 22   |
| 3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez .....                                    | 22   |
| 3.2. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi ve Hayvanların Temini..... | 22   |
| 3.3. Deney Hayvanları ve Grupların Oluşturulması .....                      | 22   |
| 3.4. Deney Hazırlıkları.....  | 24   |
| 3.4.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması .....                    | 24   |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.2. Beyin İnfüzyon Kitlerinin ve Ozmotik Mini Pompaların Hazırlanması.....  | 24 |
| 3.4.3. Sıçanların Operasyona Hazırlanması.....                                 | 26 |
| 3.5. Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi ve BİK İmplantasyonu..... | 26 |
| 3.6. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi .....                             | 30 |
| 3.7. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması.....                      | 31 |
| 3.8. Analizlerin Yapılması .....   | 32 |
| 3.8.1. RT-PZR Analizleri.....  | 32 |
| 3.8.2. Western Blot Analizi .....  | 34 |
| 3.8.3. Hormon Parametrelerinin Tayini .....                                    | 36 |
| 3.8.4. Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi .....                          | 41 |
| 3.8.5. Verilerin İstatistiksel Analizi .....                                   | 41 |
| 4. BULGULAR.....   | 42 |
| 4.1. Asprosinin GnRH mRNA Seviyesi Üzerine Etkisi .....                        | 42 |
| 4.2. Asprosinin GnRH Protein Seviyesi Üzerine Etkisi .....                     | 43 |
| 4.3. Asprosinin Serum FSH Seviyesi Üzerine Etkisi.....                         | 44 |
| 4.4. Asprosinin Serum LH Seviyesi Üzerine Etkisi.....                          | 45 |
| 4.5. Asprosinin Serum Testosteron Seviyesi Üzerine Etkisi .....                | 46 |
| 4.6. Asprosinin Epididimis Ağırlıkları Üzerine Etkisi .....                    | 47 |
| 4.7. Asprosinin Sperm Parametrelerinin Değerlendirmesi .....                   | 49 |
| 4.7.1. Asprosinin Sperm Yoğunluğu Üzerine Etkisi .....                         | 49 |
| 4.7.2. Asprosinin Sperm Hareketliliği Üzerine Etkisi .....                     | 50 |
| 4.7.3. Asprosinin Sperm İleri Hareketliliği Üzerine Etkisi.....                | 51 |
| 5. TARTIŞMA .....  | 52 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....  | 56 |
| KAYNAKLAR .....  | 57 |
| EKLER.....   | 67 |
| EK 1. ETİK KURUL KARARI.....   | 67 |
| EK 2. ÖZGEÇMİŞ.....  | 68 |

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmama maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no: TYL-2020-2185),

Tezimin tüm aşamalarında katkı sağlayan ve her koşulda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Suat Tekin 'e, Fizyolojinin temel ilkelerini öğrendiğim İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarım, RT-PZR ve Western Blot analizlerinin yapılmasına katkı sağlayan Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Yavuz ERDEN 'e tez çalışmamın deneysel aşamalarındaki katkılarından dolayı asistan arkadaşlarım Öğr. Gör. Mehmet Refik BAHAR, Arş. Gör. Dilara ALTAY ÖZTÜRK, Güldeniz ŐEKERCİ, Furkan YÜKSEL ve Engin KORKMAZ 'a,

Ömrüm boyunca bana her zaman sevgisini gösterip tüm koşullarda destekçim olan annem Belgin KESKİN başta olmak üzere canım aileme,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

**Tuba KESKİN**

## ÖZET

### Erkek Sıçanlara İntraserebroventriküler Asprosin Uygulamasının Üreme Hormonları Üzerine Etkileri

**Amaç:** Asprosin beyaz yağ dokudan salgılanan ve hepatik glikoz salınımını arttıran protein yapılı bir hormondur. Asprosinin beyin ve testis dokusunda lokalize olduğu, bununla birlikte asprosin uygulamasının spermilerin ilerleyici hareketini arttırdığı bilinmektedir. Bu çalışma, merkezi asprosin infüzyonunun hipotalamus hipofiz testiküler aksında görev alan hormonlar ile sperm hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada 40 adet *Sprague Dawley* ırkı erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol, sham, 34 ve 68 nM asprosin olmak üzere dört gruba ayrıldı (n=10). Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken sham ve deney gruplarındaki sıçanların lateral ventriküllerine beyin infüzyon kiti implant edildi ve 14 gün süresince infüzyon (Sham grubu için yapay beyin omurilik sıvısı, uygulama grupları için 34 ve 68 nM asprosin) gerçekleştirildi. Deney sonunda sıçanların hipotalamus, kan ve epididimis dokuları toplandı. Hipotalamus dokusunda RT-PCR ve Western Blot yöntemleriyle GnRH mRNA ve doku protein düzeyleri belirlendi. Kan örneklerinden ELISA yöntemi kullanılarak serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri, epididimis dokusunda ise sperm hücreleri incelendi.

**Bulgular:** Asprosin uygulanan grupların GnRH mRNA ve protein ifadeleri kontrol ve sham gruplarına kıyasla yüksekti ( $p<0.05$ ). Asprosin infüzyonunun serum FSH, LH ve testosteron seviyelerini de arttırdığı belirlendi ( $p<0.05$ ). Ayrıca asprosin uygulanan gruplarda sperm yoğunluğunun, hareketliliğinin ve ileri hareketinin arttığı görüldü ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışma merkezi olarak uygulanan asprosinin hipotalamus hipofiz testiküler aksta görev alan hormonlar ve epididimis dokusu üzerinde aktive edici özelliğe sahip olabildiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar asprosinin infertilite tedavisinde ele alınması gereken önemli bir protein/biyobelirteç olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Asprosin, FSH, GnRH, LH, Testosteron, Sperm.

## ABSTRACT

### Effects of Intracerebroventricular Asprosin Administration on Reproductive Hormones in Male Rats

**Aim:** Asprosin is a protein hormone secreted from white adipose tissue and increases hepatic glucose release. Known that asprosin is localized in brain and testicular tissue, however, administration of asprosin increases progressive movement of sperms. This study was carried out to investigate effects of central asprosin infusion on hormones and sperm cells in hypothalamus pituitary testicular axis.

**Materials and Methods:** Forty male *Sprague Dawley* rats were used in study. Rats were divided into four groups control, sham, 34 and 68nM asprosin (n=10). While application was't made to control group, brain infusion kit was implanted into lateral ventricles of rats in sham and experimental groups infusion (artificial cerebrospinal fluid for sham, 34 and 68nM asprosin for administration groups) was performed 14 days. At end of experiment, hypothalamus, blood and epididymis tissues of rats were collected. GnRH mRNA and protein levels were determined in hypothalamus tissue by RT-PCR and Western Blot methods. Serum LH, FSH and testosterone levels were analyzed from blood samples using ELISA method, and sperm cells in epididymis tissue.

**Results:** GnRH mRNA and protein expressions of asprosin treated groups were higher than control and sham groups ( $p<0.05$ ). It was determined that asprosin infusion also increased serum FSH, LH and testosterone levels ( $p<0.05$ ). In addition, sperm density, motility and forward movement were found to be increased in asprosin applied groups ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** This study demonstrates that centrally administered asprosin can activate hormones in hypothalamus pituitary testicular axis and epididymis tissue. Results obtained suggest that asprosin is important protein/biomarker that should be considered in treatment of infertility.

**Keywords:** Asprosin, FSH, GnRH, Infertility, LH, Testosterone.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                |   |
|----------------|---|
| <b>ArkN</b>    | : Arkuat nükleus                        |
| <b>AgRP</b>    | : Aguti ilişkili protein                |
| <b>BİK</b>     | : Beyin infüzyon kiti                   |
| <b>BOS</b>     | : Beyin omurilik sıvısı                 |
| <b>BYD</b>     | : Beyaz yağ doku                        |
| <b>cAMP</b>    | : Siklik adenozinmonofosfat             |
| <b>cDNA</b>    | : Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit   |
| <b>DNA</b>     | : Deoksiribo nükleik asit               |
| <b>FBN1</b>    | : Fibrilin 1                            |
| <b>FSH</b>     | : Folikül uyarıcı hormon                |
| <b>HHT</b>     | : Hipotalamus-hipofiz-testiküler        |
| <b>GnRH</b>    | : Gonadotropin salgılatıcı hormon       |
| <b>icv</b>     | : İntraserebroventriküler               |
| <b>ip</b>      | : İntraperitonal                        |
| <b>NPS</b>     | : Neonatal progeroid sendromu           |
| <b>LH</b>      | : Luteinize edici hormon                |
| <b>OLFR734</b> | : Olfaktör reseptör 734                 |
| <b>PKOS</b>    | : Polikistik over sendromu              |
| <b>PKA</b>     | : Protein kinaz A                       |
| <b>POMC</b>    | : Pro-opiomelanokortin                  |
| <b>PVN</b>     | : Paraventriküler nükleus               |
| <b>RNA</b>     | : Ribonükleik asit                      |
| <b>RT-PZR</b>  | : Reel time polimeraz zincir reaksiyonu |
| <b>SF</b>      | : Serum fizyoloji                       |
| <b>SON</b>     | : Supraoptik nükleus                    |
| <b>T2DM</b>    | : Tip 2 Diyabet                         |
| <b>VKİ</b>     | : Vücut kitle indeksi                   |
| <b>VMN</b>     | : Ventromediyal nükleus                 |
| <b>yBOS</b>    | : Yapay beyin omurilik sıvısı           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 2.1. Asprosin reseptörü OLF734'ün glikoz metabolizmasındaki rolü .....   | 4  |
| Şekil 2.2. Asprosinin insülin salınımı ve iştah mekanizmasındaki fizyolojik rolü .....   | 6  |
| Şekil 2.3. Hipotalamusun lokalizasyonu .....   | 11 |
| Şekil 2.4. Hipotalamus nükleusları ve hipofizer portal dolaşım.....  | 12 |
| Şekil 2.5. Hipofizden salgılanan hormonlar ve etkilediği organlar .....  | 15 |
| Şekil 2.6. Testis ve epididimis yapısı .....   | 16 |
| Şekil 2.7. Spermatogenez aşamaları .....   | 19 |
| Şekil 2.8. Hipotalamus – hipofiz – testiküler aks .....  | 21 |
| Şekil 3.1. Beyin infüzyon kiti ve ozmotik mini pompa.....  | 25 |
| Şekil 3.2. OMP'nin doldurulması (A), pompa setinde yer alan metal kanüllü kapağın pompa içerisine yerleştirilmesi (B), OMP'nin iç yapısı ve çalışma prensibi (C). .....  | 26 |
| Şekil 3.3. Sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesi (A), kesi bölgesine povidon iyodin sürülmesi (B), kafa derisinin kesilerek kemik dokuya ulaşılması (C) ve bregma noktasının belirlenmesi (D). .....   | 27 |
| Şekil 3.4. Sıçan beyin atlası referans alınarak belirlenen lateral ventrikül koordinatları   | 28 |
| Şekil 3.5. Lateral ventrikül için delinecek bölgenin işaretlenmesi (A) ve matkapla delinmesi (B).....  | 28 |
| Şekil 3.6. Beyin infüzyon kitinin delinen kısımdan lateral ventriküle indirilmesi (A), kanül etrafının dental cement ile yapıştırılması (B), Alzet tutucunun çıkarılması (C), kanül başının kesilmesi (D) ve dış yapıştırıcısıyla kaplanması (E). .....  | 29 |
| Şekil 3.7. Sıçanların ense derisinde bulunan kanülün tespit edilmesi (A) ense derisine açılan kesiden kanül ucunun çıkartılması ve kanül ucunun çıkartılarak kontrol edilmesi (B), kanülün fazla kısmının kesilmesi (C), ense derisinin genişletilmesi (D) ve OMP takılarak infüzyonun başlatılması (E). ..... | 31 |
| Şekil 3.8. RT-PZR analiz protokolüne genel bakış. ....   | 33 |
| Şekil 3.9. Western Blot analizine genel bakış. ....  | 35 |
| Şekil 3.10. Western Blot için hazırlanan sandviçin yapısı. ....  | 36 |
| Şekil 3.11. Serum LH ve FSH ELISA standart solüsyonunun dilüe edilmesi. ....   | 37 |
| Şekil 3.12. Serum LH ve FSH düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni.....   | 38 |
| Şekil 3.13. Serum testosteron ELISA kit standartının dilüe edilmesi. ....  | 39 |
| Şekil 3.14. Serum testosteron düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni.....   | 40 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 4.1.</b> Asprosinin hipotalamus dokusundaki GnRH mRNA ifadesi üzerine etkisi. .    | 42 |
| <b>Şekil 4.2.</b> Asprosinin hipotalamus dokusundaki GnRH protein ifadesi üzerine etkisi... | 43 |
| <b>Şekil 4.3.</b> Asprosinin serum FSH seviyesi üzerine etkisi. ....                        | 44 |
| <b>Şekil 4.4.</b> Asprosinin serum LH seviyesi üzerine etkisi. ....                         | 45 |
| <b>Şekil 4.5.</b> Asprosinin serum testosteron seviyesi üzerine etkisi. ....                | 46 |
| <b>Şekil 4.6.</b> Asprosin infüzyonunun sağ epididimis ağırlığı üzerine etkisi .....        | 47 |
| <b>Şekil 4.7.</b> Asprosin infüzyonunun sol epididimis ağırlığı üzerine etkisi.....         | 48 |
| <b>Şekil 4.8.</b> Asprosinin sperm yoğunluğu üzerine etkisi. ....                           | 49 |
| <b>Şekil 4.9.</b> Asprosinin sperm hareketliliği üzerine etkisi. ....                       | 50 |
| <b>Şekil 4.10.</b> Asprosinin sperm ileri hızlı hareketliliği üzerine etkisi. ....          | 51 |



## TABLULAR DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Hipotalamustan salgılanan hormonların ön hipofize etkisi ..... | 13 |
| <b>Tablo 3.1.</b> yBOS solüsyon içeriği .....                                    | 24 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Primer dizilimleri .....                                       | 34 |



# 1. GİRİŞ

İnfertilite çiftlerin bir yıl süresince korunma metodu kullanmadan cinsel ilişkiye girmesi ve sonuçta çocuk sahibi olamaması olarak yer almaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü tarafından önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen infertilite günümüzde çiftlerin %10–15'ini etkileyen bir problemdir (2, 3). 2017 yılında Amerikan Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi tarafından elde edilen veriler 15–44 yaş arası evli kadınların % 14.2'sinin infertil olduğunu göstermektedir (4). 2013 yılında yayımlanan fertilite rehberi verilerine göre; İngiltere'de her 7 çiftten 1'inde kısırlık problemi görülmektedir (5). Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması sonuçları ise; 30 yaş altındaki evli kadınların %48'i aile planlaması kullanamama sebebi olarak gebe kalamama veya infertiliteyi göstermiştir (6). İnfertilitenin cinsiyete göre dağılımının incelendiği araştırmalar erkek ve kadınlarda infertilitenin eşit olduğunu ortaya koymuştur (7). Erkek infertilitesinin çeşitli çalışmalar neticesinde birçok sebebi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları bozulmuş spermatogenez, düşük sperm sayısı, anormal sperm morfolojisi, beslenme ve endokrin bozukluklar, alkol ve sigara kullanımınıdır. İnfertiliteyi etkileyen bu sebepler erkek üreme fizyolojisinde önemli bir role sahip olan hipotalamus–hipofiz–testiküler (HHT) aksın yapısını da bozmaktadır (8). HHT aksının bozulması gonadların fizyolojik seviyede testosteron ve sperm üretmemesine neden olur (9).

HHT aksının ana misyonu erkek üreme sisteminde görev alan hormonların salgısını kontrol etmek, sağlıklı sperm hücresi oluşumu ve olgunlaşmasını sağlamaktır (10). HHT aksında lokalize olan hipotalamus, ön hipofiz bezini uyarıcı gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgılar (11). Portal sistem yoluyla uyardığı ön hipofiz bezinden gonadotropik hormonlar olan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormonun (LH) salgısını gerçekleştirir (12). Ön hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH testislerdeki hedef hücrelerde siklik adenozinmonofosfat (cAMP) ikinci haberci sistemini aktifleştirerek etkisini hücresel düzeyde gösterir. FSH hormonu testislerde yer alan sertoli hücrelerini uyararak cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin salgısını ve spermatogenezi gerçekleştirir. LH salgısı ise leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımını uyarır (12). HHT aksının bu işleyişini etkileyen bazı protein yapılı hormonlar adipoz doku tarafından üretilir (13). Adipoz doku bir zamanlar sadece bir enerji depolama alanı olarak kabul edilmesine rağmen, günümüzdeki bilgiler yağ dokunun aktif bir endokrin organ olarak görev yaptığını ve adipokin yapılı proteinlerin salgılanmasında görev aldığını (14)

bildirmektedir (15, 16). Son literatür verileri yağ dokunun adipokin yapılı hormon salgılaması nedeniyle bir endokrin bez olduğunu ortaya koymaktadır (17). Birçok araştırma bu hormonların fertilité üzerinde olumlu veya olumsuz etkiler meydana getirdiğini göstermiştir (14, 18, 19). Beyaz yağ doku (BYD) orijinli birçok adipokin için literatürde artık “Adipoz-Beyin Aksı” olarak yeni bir aksın tanımı yapılmaktadır (20).

Beyaz yağ dokudan (BYD) salgılanan asprosin karaciğerde hepatik glikoz salınımını sağlayan bir adipokindir (21). 2016 yılında keşfedilen asprosinin vücutta yağ doku dışında karaciğer, böbrek ve testis dokularında lokalize olduğu, kan beyin bariyerini geçerek iştah mekanizmasını etkilediği rapor edilmiştir (21, 22). Asprosin hormonunun olfaktör reseptör 734 (OLFR734) adı verilen bir koku reseptörüne bağlanarak cAMP yolağını kullandığı yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir (23). Asprosin ve reseptörünün testislerde lokalize olmasından yola çıkılarak, erkek fertilitesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada asprosinin sperm ilerleyici hareketi arttırdığı rapor edilmiştir (24).

Bu bulgular asprosinin HHT aksı hormonları ve sperm parametreleri üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışma sıçanlara intraserebrovenriküler (icv) asprosin infüzyonunun üreme sisteminde önemli bir yeri olan HHT aksında görev alan hormonları ve sperm parametreleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Asprosin

#### 2.1.1. Keşfi ve İsimlendirilmesi

2016 yılında Romere ve ark. tarafından keşfedilen asprosin açlıkla indüklenen protein yapılı bir hormondur. BYD'den salgılandığı yakın zamanda belirlenen asprosin Yunanca beyaz anlamına gelen "aspros" kelimesinden türetilmiştir (21). Neonatal Progeroid Sendromu (NPS) hastalığı ile keşfedilen asprosin, Fibrilin 1 (FBN1) geni tarafından C-terminal bölünme sonucu sentezlenir. FBN1 geninde mutasyon meydana gelmesi sonucu oluşan NPS hastalığında serum asprosin hormonunda düşüş olduğu bildirilmiştir (21).

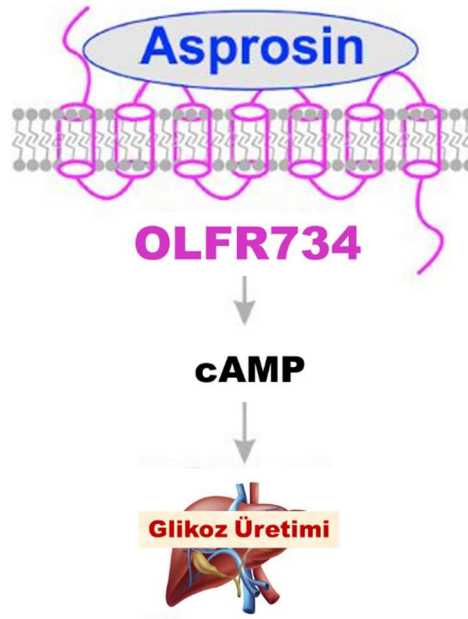
#### 2.1.2. Biyokimyasal Yapısı ve Lokalizasyonu

FBN1 geni üzerinde yapılan çalışmalarda asprosin hormonunun porfirilinin C-terminalinin bölünmesi sonucu üretildiği bulunmuştur. FBN1 geninin 65-66. eksonları arasında 11 aminoasit ve 66. eksonunda da 129 aminoasit asprosin kodlar. Asprosin toplam 140 aminoasitten oluşur (21, 22). İnsanların plazma asprosin miktarının tokluk durumunda yaklaşık 10 nM, açlık durumunda ise yaklaşık 18 nM olduğu ve bu artışın anlamlı bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (21). Asprosinin yarılanma ömrünün araştırıldığı bir çalışmada subkutan 60 µg asprosin uygulaması sonucu yarılanma ömrünün 145 dk olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada intravenöz uygulanan asprosin kan beyin bariyerini geçerek beyin omurilik sıvısında (BOS) tespit edilmiştir (22).

Asprosin hormonunun üretildiği FBN1 geninin farelerde en çok BYD ve akciğerde lokalize olduğu, insanlarda ise BYD, beyin, karaciğer ve testis dokularından eksprese edildiği elde edilen veriler arasındadır (21). Vücut dokularında histolojik analizler yapıldığında asprosin hormonunun karaciğer hepatositleri, böbrek kortikal distal tübül hücreleri, kalp kardiyomiyositler, mide fundus yüzey epitel hücreleri, testis interstisyel Leydig hücreleri ve beyin kortikal nöronlarında lokalize olduğu tespit edilmiştir (25).

### 2.1.3. Reseptörü

Olfaktör (koku) reseptör ailesinin bir üyesi olan OLFR734 reseptörünün 2019 yılında yapılan çalışma ile hepatik glikoz üretimini modüle etmek amacıyla asprosin reseptörü olarak görev yaptığı bulunmuştur (Şekil 2.1.) (23). Hipotalamusta bulunan koku duyu nöronlarına gelen uyarılar ve koku soğancığı yardımıyla yemek seçimi, yemekten zevk alma, duysal ve hormonal sinyallere yanıt olarak enerji homeostazının kontrolü gerçekleşir (26). Koku alma reseptörü periferik dokularda bulunur ve iskelet kası yenilenmesi, sperm kemotaksisi, prostat kanser hücre poliferasyonu, böbrekte glikozu işleme gibi görevlerde yer alır (27-30). Olfaktör reseptörleri G proteinine bağlanarak cAMP yolağını kullanıp hücre zarından geçerek metabolize olur (31, 32).



Şekil 2.1. Asprosin reseptörü OLFR734'ün glikoz metabolizmasındaki rolü (23).

OLFR734 reseptörü yapılan çalışmalarla vücut dokularından en çok koku soğancığı, koku epiteli, testis, karaciğer ve böbrek dokularında lokalize olduğu bilinmektedir. OLFR734 reseptör eksikliği olan farelerle yapılan bir araştırmada bu farelerde glikogenezin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca sağlıklı farelere yapılan asprosin uygulamasının açlık ve obezite durumunda glikoz homeostazını düzenlediği rapor edilmiştir (23).

#### 2.1.4. Etki Mekanizması

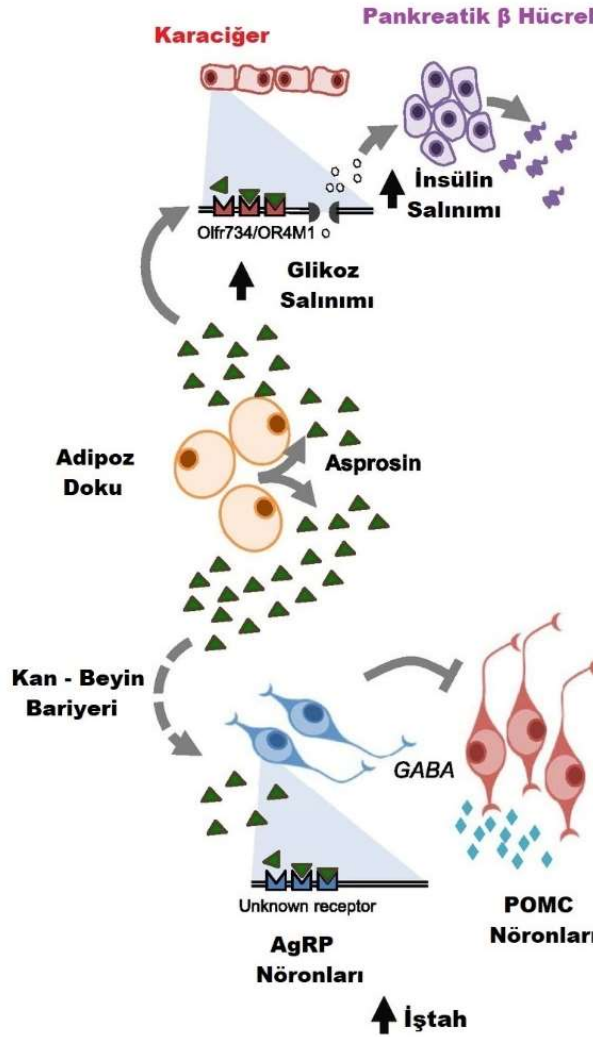
Asprosin hormonunun hücre içerisindeki etkisini ortaya çıkarmak amacıyla yapılan bir çalışmada 8-12 haftalık farelerden izole edilen hepatosit hücrelerinde cAMP ve Protein Kinaz A (PKA) aktiviteleri ölçülmüştür. Çalışma bulgularına göre asprosin cAMP – PKA ikincil haberci sistemi yoluyla hücre içi aktivitesini göstermiştir. Aynı çalışmadan asprosinin *in vivo* ve *in vitro* olarak G protein – cAMP – PKA eksenini yoluyla hepatosit glikoz salınımını arttırdığı elde edilen veriler arasındadır (21). Yapılan bir başka çalışmada yüksek doz glikoz ile indüklenen farelerin hasar gören kardiyak mikrovasküler endotel hücreleri üzerinde asprosinin etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak asprosinin bu hücrelerde oksidatif stres hasarını azalttığı, spartin sinyal yolağının aşağı regülasyonuna neden olduğu bulunmuştur (33). İhtiyaç duyulmayan veya anormalleşerek organizmaya tehdit oluşturan hücrelerden kurtulma biçiminde gerçekleşen programlanmış hücre ölümüne apoptoz adı verilir (12). Apoptozun bazı durumlarda dışarıdan bir etki olması sonucu gerçekleşebildiği belirlenmiştir (34). Hidrojen peroksit etkisi ile mezenkimal stroma hücresinde hasar oluşturulmuş bir çalışmada asprosinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışmada hidrojen peroksit uygulanmış hücreler iki gruba ayrılmış ve 5 µg/ml asprosin uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonuç olarak asprosinin hücreleri hidrojen peroksit kaynaklı apoptozdan koruduğu tespit edilmiştir (35).

#### 2.1.5. Fizyolojik Roller

##### İnsülin Metabolizması Üzerine Etkisi

Yapılan çalışmalar neticesinde BYD'den salgılanan asprosin, (21) karaciğerde varlığı tespit edilen OLF734 reseptörüne bağlanarak pankreatik β hücrelerinden hepatik glikoz salınımını gerçekleştirmektedir (Şekil 2.2.) (36). Karaciğerde G proteini – cAMP – PKA yolağını aktive ederek kan dolaşımına hızlı glikoz salınımı sağlayan asprosinin, insülin direnci olan insanlarda yüksek plazma seviyesine sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca asprosin hormonunda immünolojik veya genetik yollarla meydana gelebilecek işlev kaybının karaciğerden glikoz ve pankreastan insülin salınımını azalttığı rapor edilmiştir (21). OLF734 asprosinin etkilerine aracılık eden bir reseptör olarak kabul edilmiş ancak asprosinin etkilerine aracılık eden tek reseptör olmadığı belirlenmiştir. Asprosinin, fare iskelet kası hücrelerinde ifade edilen ancak henüz tanımlanmamış

reseptörler/reseptörlere bağlanarak, PKC $\delta$ /SERCA2 aracılı endoplazmik retikulum (ER) stresini uyarak insülin duyarlılığını bozduğu ortaya konmuştur (37).



**Şekil 2.2.** Asprosinin insülin salınımı ve iştah mekanizmasındaki fizyolojik rolü (36).

Pankreatik  $\beta$ -hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu vücutta insülin direnci olduğu birçok araştırma verisiyle ortaya konmuştur (38, 39). Buna ek olarak yapılan bir çalışmada asprosinin pankreatik  $\beta$  hücrelerinde Toll benzeri reseptör 4'e bağlanarak hücrel reaktif oksijen üretimini ve proinflamatuvar sitokinleri arttırdığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak pankreatik  $\beta$  hücrelerinin inflamasyonunu ve apoptozunu desteklediği ve bu yolla insülin salgısını azalttığı bulunmuştur (40). Ayrıca  $\beta$ -hücre hasarı Tip 2 Diyabet (T2DM) hastalarında görülen önemli bir bulgudur (41). Asprosin ile insülin direncinin *in vitro* ortamda araştırıldığı bir çalışmada asprosinin  $\beta$ -hücre hasarını arttırabileceği ve insülin direnci ile asprosin arasında pozitif ilişki olduğu bulunmuştur (42). T2DM

hastaları üzerinde yapılan bir başka araştırmada T2DM hastası bireylerin plazma asprosin seviyelerinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bu hastalarda asprosinin açlık kan şekeri, HbA1c ve HOMA-IR değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (43). T2DM hastalarında metabolik parametreler ile asprosin düzeyleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir araştırmada asprosin seviyesinin T2DM hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca T2DM’li metabolik sendroma sahip bireylerde T2DM hastası bireylere göre asprosin seviyesi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (44). Streptozotosin ile indüklenen diyabet modelinde asprosinin varlığını göstermek ve diyabet sonucu meydana gelecek değişiklikleri incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada sıçanlara intraperitoneal (ip) 50 mg/kg streptozotosin uygulanmıştır. Sonrasında alınan karaciğer, kalp, böbrek, beyin ve mide dokusunda asprosin düzeyi incelenmiştir (25). Sonuç olarak diyabetik sıçanlarda kontrol grubu sıçanlara göre karaciğer, böbrek ve kalp dokularında asprosinin azaldığı, mide dokularında arttığı, beyin dokusunda ise anlamlı bir fark olmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca diyabetik sıçanlarda serum asprosin seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığı elde edilen veriler arasındadır. Bu sonuçlar asprosinin böbrek, kalp ve karaciğer dokularında diyabetin patolojik etkilerinden koruyabileceğini göstermiştir (25). Yeni tanımlanan glikojenik bir hormon olan asprosinin diyabet gelişimi üzerindeki etkisinin incelendiği bir araştırmada diyabet modeli oluşturulan farelere asprosin uygulaması yapılmış. Çalışma sonucunda asprosin uygulamasının sağlıklı hayvanlarda kan şekerini artırırken diyabetik hayvanlarda kan şekerini değiştirmede rapor edilmiştir. Asprosin uygulamasının irisin düzeyini düşürdüğü, ghrelin düzeyini yükselttiği, leptin düzeyini ise değiştirmede elde edilen bulgular arasındadır. Bununla birlikte, asprosinin diyabetik farelerde hepatik trigliserid, kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein seviyelerini düşürdüğü belirtilmiştir (45).

### **Obezite ve Gıda Alımı zerine Etkisi**

Adipokin yapıda olan asprosin vücutta iştah mekanizmasının düzenlenmesinde görev alır. FBN1 geni nakavt farelere 30 µg asprosin verilmiş ve bu farelerde besin alımında anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur (22). Kan beyin bariyerini geçtiği bilinen asprosinin cAMP - Protein Kinaz A yolağını kullanarak aguti ilişkili protein (AgRP) nöronlarını aktive ettiği, proopiomelanokortin (POMC) nöronlarını ise baskıladığı ve sonuçta besin alımında artışa neden olduğu elde edilen veriler arasındadır (şekil 2.3.)

(36). Yapılan bir çalışmada da fare hipotalamusu 34 nM asprosin ile 2 saat inkübe edilmiş ve sonrasında hipotalamusun AgRP başta olmak üzere bazı bölgelerinde nöron ateşlemesinin arttığı belirlenmiştir (22).

Asprosinin obezite ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada obez ve sağlıklı toplam 119 çocuğun plazma asprosin seviyesine incelenmiş ve obez çocuklarda plazma asprosin değeri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (46). Obez bireyler üzerinde yapılan başka bir çalışmada vücut kitle indeksi (VKİ)>35 kg/m<sup>2</sup> olan bireylerin normal VKİ'ye (18-25 kg/m<sup>2</sup>) sahip bireylere göre plazma asprosin seviyesinin anlamlı olarak yüksek olduğu elde edilen veriler arasındadır (47). Serum ve tükürük asprosin miktarlarının obezite ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmada da diğer çalışmalara benzer olarak obez bireylerde normal ve düşük kilolu bireylere göre serum ve tükürük asprosin miktarı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (48).

### **Üreme Sistemi Üzerine Etkisi**

İnfertilite vakalarının dörtte biri erkeklerin sperm kalitesinin azalmasına bağlıdır. Sperm kalitesinin en önemli göstergeleri; sperm sayısı, canlılığı ve ilerleyici hareketliliğidir (49, 50). Olfaktör reseptörlerinden birkaçının sperm kemotaksisini modüle ettiği bildirilmiştir. Bu bilgi temel alınarak testislerde yüksek miktarda bulunan asprosin reseptörünün üreme sistemi ve infertilite üzerindeki etkisi araştırılmıştır (23, 24). Yapılan bu çalışmada sağlıklı ve OLFR734 reseptörü olmayan 10 ve 40 haftalık fareler kullanılmıştır. Çalışmada sperm kalitesi, canlılığı, sayısı ve morfolojisi incelenmiş, sağlıklı ve reseptörü olmayan fare grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. OLFR734 reseptörü olmayan farelerin sperm ilerleyici hareketi reseptörü olan farelere göre azalmıştır (24).

Asprosinin, OLFR734 reseptörüne bağlanarak cAMP sinyalini aktifleştirdiği rapor edilmiştir (23). cAMP yolağı sperm kapasitesi, ilerleyici hareketi ve akrozom reaksiyonu için kritik bir öneme sahip olduğu elde edilen veriler arasındadır. Aynı çalışmada 10 gün boyunca 60 µg/kg asprosin tedavisi sonrasında sağlıklı 10 ve 40 haftalık farelerde fertilizasyonun arttığı, ancak reseptörü olmayan farelerde artış olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Asprosin tedavisi genç ve yaşlı farelerdeki sperm ilerleyici hareketliliğinin geri kazanılmasında benzer sonuçlar vermiştir. Bu durum asprosin veya OLFR734 reseptörü agonistlerinin doğurganlığı tedavi etmek için potansiyel ajan olabileceğini göstermiştir (24). Ayrıca araştırılan bir vakada asprosin kodlayan FBN1

geninin mutasyona uğradığı NPS hastasının sperm sayımı yapılmıştır. Sonuç olarak FBN1 geni mutasyonu ile azosperminin ilişkili olduğu rapor edilmiştir (51).

Polikistik over sendromu (PKOS) insülin direnci ile ilişkili bir üreme bozukluğudur. PKOS'lu kadınların klinik veya laboratuvar bulgularında menstrual düzensizlik, yumurtalık kistleri ve hiperandrojenizm görülür (52). Asprosin hormonunun da G protein- cAMP- PKA yolunu aktive ederek karaciğerden glikoz sekresyonunu arttırdığı, yüksek asprosin seviyesinin insan ve farede insülin direnci ile ilişkili olduğu literatürde vurgulanmaktadır (22). PKOS'lu kadınlarla sağlıklı kadınlar arasında asprosin düzeylerinin karşılaştırılması, asprosin ve metabolik parametreler arasında bir bağlantı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada kan parametreleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucuna göre bozulmuş androjen durumunu belirlemede kullanılan serbest androjen indeksi ve LH hormon seviyesi asprosin proteini ile pozitif korelasyon göstermiştir. Ayrıca plazma asprosin seviyesi PKOS'lu kadınlarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (53). PKOS hastaları üzerinde yapılan bir başka çalışmada plazma asprosin seviyelerinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak yüksek olduğu ve bu hastalarda asprosin ile testosteron seviyesinin pozitif korelasyon gösterdiği elde edilen veriler arasındadır (43). Asprosin ve üreme sistemini düzenleyen hormonların ilişkisinin incelendiği farklı bir araştırmada da asprosinin testosteron ve LH hormonları ile negatif, prolaktin hormonuyla pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (54). Yapılan bir başka çalışmada streptozotosin ile indüklenen diyabet modelinde testis dokusu incelenmiş ve sonuç olarak diyabetik sıçanların testis dokularında artan asprosin düzeylerinin, sperm enerji ihtiyacını karşılamaya yönelik olabileceği ortaya konmuştur (25).

### **Diğer Fizyolojik Etkileri**

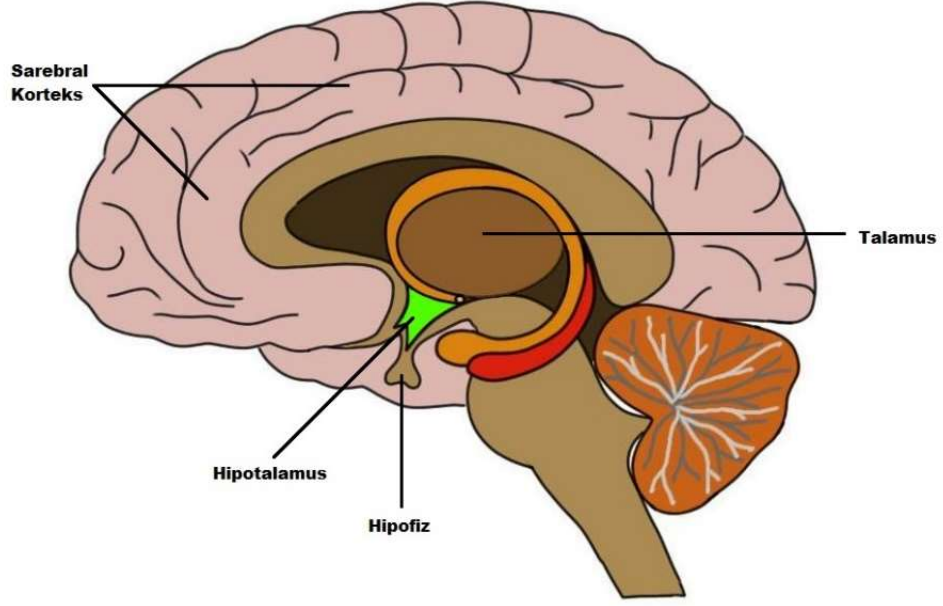
Kanser hastalarında oldukça yüksek görülen bulguların başında anoreksi ve kaşeksi gelir. Ayrıca kanser türlerinin çoğu glikoz metabolizması ile ilişkilidir (55, 56). Asprosin hormonuyla ilgili yapılan araştırmalarda asprosinin glikoz ve iştah metabolizmasında aktif rol aldığı ortaya konmuştur (57). Kanser hastalarında plazma asprosin seviyelerini değerlendirip, kanserin klinik – patolojik özellikleri, anoreksi ve kaşeksiyle asprosin arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla bir çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada asprosinin kanser hastalarında azalması nedeniyle kanser anoreksisinin ortaya çıktığı ancak asprosinin kanserin ilerlemesine dahil olmadığı raporlanmıştır (58). Yapılan bir başka araştırmada malign mezotelyoma kanseri olan bireylerden alınan

dokular immünohistokimyasal yöntemle incelenmiş ve hastalarında asprosinin anlamlı olarak arttığı elde edilen veriler arasındadır. Bu nedenle asprosinin malign mezotelyoma hastalığının teşhis ve tedavisinin değerlendirmesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (59).

Bir çalışmada akut koroner sendrom hastalarında sendromun şiddetinin asprosin düzeyi ve koroner arter hastalığının anatomik ciddiyeti ile ilişkisi incelenmiştir. Çalışmada kararsız angina pectoris tanısı konmuş hastaların plazma asprosin seviyelerinin anlamlı olarak yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu netice ile asprosinin koroner arter hastalığını belirlemede etkin bir belirteç olabileceği rapor edilmiştir (60). Bunun tersine kalpte koruyucu roller üstlenebildiği düşünülen asprosinin, glikozla indüklenen apoptotik fare kardiyomiyositlerinde oksidatif hasarı azalttığı ve hücreleri koruyucu etki sergilediği bildirmiştir (61).

## **2.2. Hipotalamus**

Hipotalamus, üçüncü ventrikülün her iki tarafında, talamusun hemen altında bulunan Şekil 2.3.'te gösterildiği gibi beynin küçük bir parçasıdır. Optik sinirin iki yolunun hemen içinde ve hipofiz bezinin hemen üstünde bulunur (62). Hipotalamus, toplam beyin hacminin sadece %2'sini oluşturmasına rağmen, hipofiz fonksiyonunun ve homeostatik dengenin anahtar düzenleyicisidir (63). İç ortamın kimyasal dengesini ve sıcaklığını koruyan karmaşık otonom mekanizmalarının çoğu hipotalamusta bulunur. Ayrıca hipotalamus limbik sistemle birlikte duygusal ve içgüdüsel davranışı düzenleyen bir birim olarak çalışır (64). Limbik sistemde yer alan hipotalamus aynı zamanda birçok hayati fonksiyonu yerine getirmede önemli rol oynar. Tüm bu veriler hipotalamusun vücudun mikroişlemcisi olarak çalıştığı ve diğer sinir sistemi öğeleri ile bilgi alışverişini yaptığını ortaya koymaktadır (65).

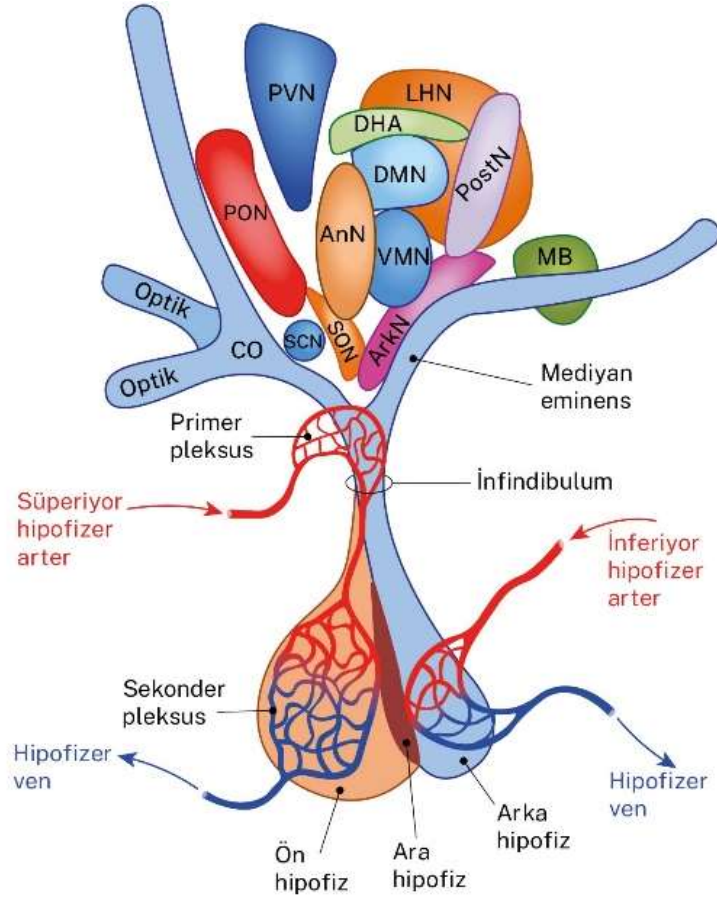


Şekil 2.3. Hipotalamusun lokalizasyonu (65).

### 2.2.1. Hipotalamusun Fonksiyonları ve Hipotalamik Nükleuslar

Otonom sistemin baş gangliyonu olarak adlandırılan hipotalamus; iştah, susama, duygusal tepki verme, cinsel istek ve daha fazlasını düzenlemekten sorumludur. Aynı zamanda otonom sinir sisteminin işleyişini de (nabız, kan basıncı, nefes alma ve uyarılma) düzenler (62, 64). Hipotalamus BOS'un (66) da etkisi ile beynin diğer bölgeleri devamlı temas halindedir. Nörotransmitter, besin maddesi vb. alışverişi BOS'un etkisi ile gerçekleşir (65).

Hipotalamus diensefalonun anterior ucunda bulunur ve pedinküller arası çekirdeklerin önünde yer alır. Çeşitli çekirdek ve nüklear alanlara ayrılmıştır. Bunlardan bazıları Şekil 2.4.'de de gösterildiği gibi paraventriküler nükleus (PVN), arkuat nükleus (ArkN) (32), ventromediyal nükleus (VMN), supraoptik nükleus (SON) ve preoptik nükleustur (PON) (13).



**Şekil 2.4.** Hipotalamus nükleusları ve hipofizer portal dolaşım (65) (PVN: paraventriküler nükleus; DHA: dorsal hipotalamik alan; LHN: lateral hipotalamik nükleus; PON: preoptik nükleus; AnN: anterior nükleus; VMN: ventromedial nükleus; DMN: dorsomedial nükleus; LHA: lateral hipotalamik alan; SCN: üst kiyazmatik nükleus; SON: supraoptik nükleus; ArkN: arkuat nükleus; MB: mamiller cisim; CO: kiyazma opikus.).

Hipotalamusta, nöronal cisimler çekirdekler halinde düzenlenmiştir. Bu karmaşık nöronal bağlantı sistemi, hipotalamik nöronlar ve diğer beyin bölgeleri arasında sürekli iletişim sağlar. Hipotalamik nükleuslar, anatomik konumlarına veya hücrelerinin ürettiği temel nöropeptidlere göre sınıflandırılabilir. Ancak bazı hipotalamik çekirdekler, birden fazla nöronal hücre tipi içerebildiğinden birden fazla fonksiyonu olabilmektedir (67). Hipotalamusta bulunan glikoz kullanım oranına duyarlı glikostat hücreleri ve leptin reseptörleri iştah mekanizmasını kontrol etmektedir. Hipotalamusta yer alan PVN, ArkN ve VMN besin alımının düzenlenmesinde kilit rol oynar (68). Hipotalamik kontrol altında olan bir başka mekanizma da susuzluktur. İçme eylemi plazma osmolaritesi ve hücre dışı sıvı hacminde meydana gelen değişimler sonucu SON ve PVN tarafından salgılanan vazopressin hormonu tarafından düzenlenmektedir (12, 64). Östrojen ve androjen duyarlı

afferent nöronlar sayesinde hipotalamusta bulunan ArkN, PON ve SON hem kadın hem de erkeklerde GnRH hormonu salgılayarak cinsel davranışı kontrol etmektedir (69).

### 2.2.2. Hipotalamustan GnRH Salgılanması

Endokrin bir bezin sentezleyerek kana verdiği kimyasal maddelere hormon adı verilir. Sentezlenen bu hormonlar çoğunlukla portal yolla hedef hücre veya dokuya taşınırlar (65). Hipotalamustan hipofiz bezine giden bu kimyasal maddeler ön hipofiz salgısının kontrol edilmesini sağlar. Bu kimyasal maddelere hipofizyotropik hormonlar adı verilmektedir (Tablo 2.1.) (64). Hipotalamusun tabanında bulunan mediyan eminens tüm hipofizyotropik hormonların hipofiz bezine taşınmadan önce birleştiği yerdir (63). Kan dolaşımında çok az miktarda olan bu hormonlar portal hipofizyal kanda yüksek miktarda bulunmaktadır. Kortikotropin salgılayan hormon, tirotropin salgılayan hormon, büyüme uyarıcı hormon ve GnRH hipofizyotropik hormonlardan bazılarıdır (Tablo 2.1.) (64).

**Tablo 2.1.** Hipotalamustan salgılanan hormonların ön hipofize etkisi (12).

| Hipofizyotropik Hormonlar              | Ön Hipofiz Bezinde Oluşan Etki                            |
|--|---|
| <b>Prolaktin Baskılayıcı Hormon</b>    | Laktotrop hücrelerden prolaktin hormon salgısını baskılar |
| <b>Büyüme Uyarıcı Hormon</b>           | Somatotroplardan büyüme hormonu salgısını uyarır          |
| <b>Tirotropin Salgılayan Hormon</b>    | Tiroid uyarıcı hormonun tirotroplardan salgısını sağlar   |
| <b>Somatostatin</b>                    | Somatotroplardan büyüme hormonunu baskılar                |
| <b>GnRH</b>                            | Gonadotrop hormonların salgılanmasını uyarır              |
| <b>Kortikotropin Salgılayan Hormon</b> | Antidiüretik hormonun kortikotroplardan salgısını uyarır  |

GnRH hormonu hipotalamustan ön hipofize salgılanarak pubertenin başlamasını ve erkek/kadın her iki cinsiyette de cinsel işlevin kontrolünü sağlar (11). GnRH

hormonunun bilinen biyokimyasal yapısı (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) 10 aminoasitten oluşur. Embriyonik dönemde GnRH burundan gelişir, koku alma sinirlerinden sonra beyinde hipotalamusa göç eder. Bu göç koku alma yollarında doğuştan anormallikler sebebiyle engellenirse GnRH nöronlarının hipotalamusa ulaşamaz ve gonadlarda pubertal olgunlaşma meydana gelmez. GnRH hormonu hipotalamusta PON ve ArKN çekirdeklerinden ön hipofize portal hipofizyal yolunu kullanarak salınır (70).

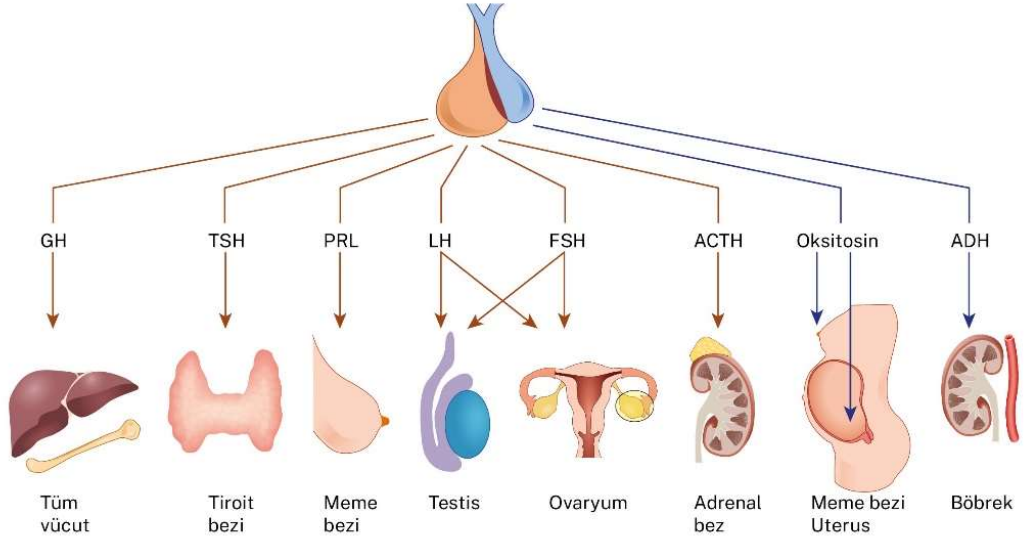
GnRH, hipofizeal portal dolaşım yoluyla ön hipofiz bezine taşınır; burada spesifik bir hipofiz hücre tipi olan gonadotrop üzerindeki kendi reseptörlerine bağlanarak gonadotropinlerin (LH ve FSH) sentezini ve salgılanmasını düzenler. Gonadotropinler sırayla sistemik dolaşıma salgılanır. Sonrasında erkeklerde spermatogenez ve androjen biyosentezini düzenlemek için gonadotropinler testisler üzerinde hareket eder (71). GnRH hormonu vücutta pulsatil ve dalgalanma şeklinde salgılanır (72). GnRH salgısının pulsatil şeklinde olması epizotik tarzda olduğunu ifade eder. GnRH'nın dalgalanma şeklinde sekresyonu kadınlarda portal dolaşımda pre-ovulatuvar faz sırasında (GnRH varlığının devamlı olduğu) ortaya çıkar (73). GnRH'nın pulsatil salgılanması hipotalamik GnRH nöronlarının kendine özgü bir özelliğidir ve üremenin gerçekleşebilmesi için pulsatil salgıyı düzenleyici mekanizmalar bir arada dengeli çalışmalıdır (69). Gonadotropinlerin ve yetişkin fonksiyonlarının uygun şekilde uyarılması ve salgılanması için GnRH'nın epizodik salgılanması zorunludur (74). Bebeklik ve çocukluk döneminde merkezi sinir sisteminin inhibisyonu ile GnRH sekresyonu ve gonadotropin seviyeleri düşüktür. Ergenlikte, bu engelleyici mekanizmalar muhtemelen sona erer ve sekresyon dengeli bir şekilde devamlılık gösterir. Yaşa bağlı olarak da GnRH salgısı yaş ilerledikçe zayıflamaya başlar. Ancak GnRH salgısı ilaç kullanımı, yoğun egzersiz ve zihinsel stres (depresyon) nedeni ile engellenebilir (68). GnRH eksikliği birçok farklı durumda ortaya çıkabildiği ve bunların hepsinin hipogonadotropik hipogonadizm olarak sınıflandırıldığı da elde edilen literatür verileri arasındadır (75).

## **2.3. Hipofiz**

### **2.3.1. Hipofiz Bezinin Fonksiyonları**

Hipofiz bezi ya da diğer ismi ile pitüiter bez vücudumuzda bulunan en sağlam kemik oyuğunun (sella turcica) altında yer alır. Hipofiz bezi vücutta çok önemli fizyolojik

işlevlere sahiptir. Bunlardan bazıları; iştah metabolizması, fertilité, süt yapımı, doğumdur. Hipofiz bezi yaklaşık 0.5 – 1 g ağırlığında olmasına rağmen endokrin sistemde kilit rol oynar (65). Hipofiz bezi ön hipofiz, ara hipofiz ve arka hipofiz şeklinde üç loba ayrılır. Ön hipofiz bezi kortikotrop, tirotrop, gonadotrop, somatotrop ve laktotrop endokrin hücre tiplerini içerir. Bu nedenle ön hipofizden çok sayıda hormon salgılanır. Bu hormonlar; büyüme hormonu, tiroid uyarıcı hormon, gonadotrop hormonlar (FSH, LH), doğum sonrası süt yapımını sağlayan prolaktin ve adrenal beze salgılanarak kortizol salınımını uyararak adrenokortikotropik hormondur (12, 70). Hipofizin arka lobundan ise doğumun gerçekleşmesini sağlayan oksitosin ve böbreklerden suyun geri emilimini sağlayan antidiüretik hormon salgılanır. Şekil 2.5.'de hipofiz bezinden salgılanan hormonlar ve etkilediği organlar gösterilmiştir (65).



**Şekil 2.5.** Hipofizden salgılanan hormonlar ve etkilediği organlar (65) (GH: büyüme hormonu; TSH: tiroid uyarıcı hormon; PRL: prolaktin; FSH: folikül uyarıcı hormon; LH: luteinize edici hormon; ACTH: adenokortikotropin hormon; ADH: antidiüretik hormon).

### 2.3.2. Hipofiz Bezinden LH ve FSH Salgılanması

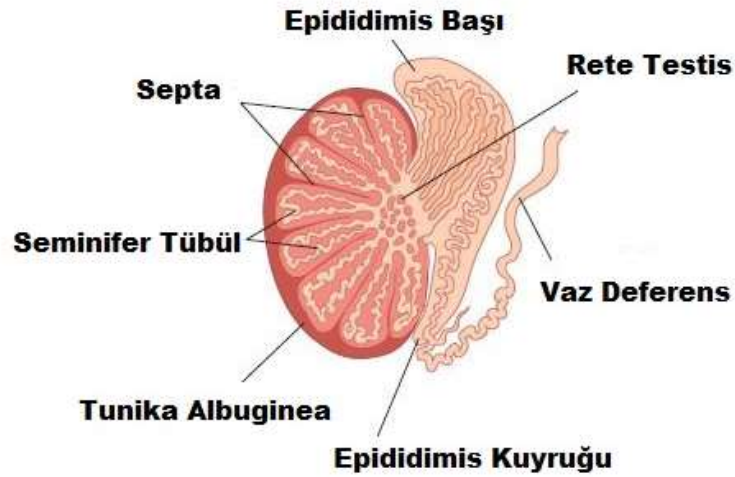
Hipotalamustan salgılanan GnRH hormonu ön hipofiz bezinden FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını uyarır. Hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan FSH ve LH erkek üreme sisteminde yer alan önemli hormonlardır (70). Erkek üreme sisteminin temel yapısı olan testisler sertoli ve leydig hücrelerinden meydana gelir. FSH hormonu testislerde yer alan sertoli hücrelerini uyararak cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin salgısını ve spermatogenezini gerçekleştirir. Ön hipofizden salgılanan diğer gonadotropik

hormon olan LH testiste bulunan leydig hücrelerini stimule ederek testosteron salgısını uyarır. FSH ve LH kadınlarda ise overi uyararak östrojen salgılanmasını ve oogenezi uyarır (12). Yaşa bağlı olarak azalan GnRH salgısının aksine LH ve FSH serum seviyelerinde yaşlı erkeklerde genç erkeklere göre daha yüksektir (76). LH ve FSH hormonları cAMP yolağını aktifleştirerek testiste bulunan leydig ve sertoli hücrelerini etkiler. cAMP ikincil haberci sistemini kullanan bu hormonlar testosteron salgısını ve spermatogenezi uyarır (65, 70).

## 2.4. Testiküler Fonksiyonlar ve Spermatogenez

### 2.4.1. Testis ve Epididimisin Yapısı

Erkek üreme sisteminde yer alan testis organı (Şekil 2.6.) dokuz yüz tane seminifer tübülden meydana gelmiştir. Spermilerin depo edildiği testis yapısında sertoli ve leyding hücreleri bulunur. Testislerde üretilen spermier ejakülatör sırasında testisin arka yüzünde epididime boşalır. Virgül görünümüne sahip olan epididimis, 5-7 metre uzunluğuna sahip sıkı bir sarmal yumaktan oluşur (12, 65, 77).



Şekil 2.6. Testis ve epididimis yapısı (70).

### 2.4.2. Testis ve Epididimisin Fonksiyonları

Erkek üreme fizyolojisinde görev alan organların başında testis gelir. Testisler erkek üreme hücresi olan spermlerin sentezlenip depolandığı bir organdır. Spermatogenez ve testosteron hormonu salgısından sorumludur. Yapılarında bulunan sertoli ve leydig hücrelerinde gerçekleşen bu olaylar testislerin erkek üreme sisteminin denetlenmesinde de anahtar role sahip olduğunu göstermektedir (65, 70). Testislerde üretilip epididimde birkaç gün depo edilen spermler epididimin kauda kısmında depolanırken hareketsiz bir durumdadır. Bu durumda spermler ovumu fertilize edebilme yeteneğine sahip değildir. Ejakülasyon ile hareketli hale gelen spermler vas deferans kanalından geçip atılır (12, 77).

### 2.4.3. Leydig Hücrelerinden Testosteron Salgılanması

Seminifer tübül hücreleri arasında lokalize olan leydig hücreleri testisin endokrin hücresi olarak çalışır. Leydig hücreleri testiste salgılanan hormonların sistemik kan dolaşımına taşınmasında görev alır. Bu hücreler, testis kütlesinin %20'sini temsil eder. Erkeklerde fetal leydig hücreleri normalde fetal dönem ve doğumu takiben birkaç hafta kadar testosteron salgılar ve sonrasında durur. Ardından oluşan erişkin leydig hücreleri puberte dönemini takiben yaşam süresi boyunca LH bağımlı testosteron salgısına devam eder. Testislerden testosteron salgılanmayan çocukluk döneminde leydig hücreleri hemen hemen hiç görülmezler (12, 70).

Pulsatil salgılanan GnRH ön hipofiz bezinden LH hormonunun salgılanmasında görev alır. Ön hipofiz bezinden salgılanan LH hormonu ise seminifer tübülde lokalize olan leydig hücresinden testosteron sekresyonunu sağlar (65). Bu etki sonucu yeterli miktarda salgılanan testosteron hipotalamus – hipofiz üzerine negatif geri bildirim etkisi gösterir ve testosteronun salgısı durdurulur (78). Testosteron insan yaşamının üç evresinde tavan yapmaktadır. Bu evrelerin ilki fetal dönemdedir ve bu dönemde testisler oluşur, erkek genital bezler gelişir. İkinci evre doğum itibariyle geçen ilk iki aydır ve fetal dönemde gelişmekte olan gonadlar olgunlaşır. Puberte dönemine kadar testosteron dinlenme evresine girer. Son evre ise puberte dönemidir ve bu dönem itibariyle tekrar pik yapan testosteron yaşam boyu devam eder (70). Testosteron erkeklerde ikincil cinsiyet karakterinin oluşmasını sağlayan androjen olarak görev yapmaktadır (78). Testosteron

etkisi ile erkeklerde kıllanma, ses kalınlaşması, kas ve kemik kütlesinde gelişim ve metabolik hızda artış meydana gelen değişimlerdir (65, 70).

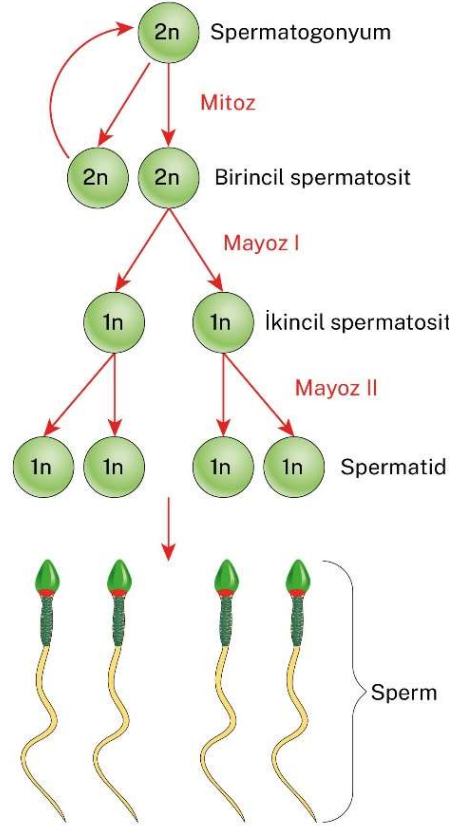
Sağlıklı genç erkeklerde testosteron salgılanması sabahları daha yüksek konsantrasyonlara ve öğleden sonraları daha düşük seviyelere sahip günlük bir ritim ile karakterizedir. Birçok çalışma, testosteron günlük ritminin yaşlı erkeklerde azaldığını ortaya koymuştur. Testosteron düzeylerindeki yaşa bağlı düşüş oranı, kronik hastalık varlığı, yağlanma, ilaç gibi faktörlerden etkilenebilmektedir. Epidemiyolojik araştırmalar düşük testosteron seviyeleri ile vücut kompozisyonundaki fiziksel fonksiyon ve hareket kabiliyetindeki değişikliklerin T2DM, metabolik sendrom, koroner arter hastalığı ve kırık gelişim riskini oluşturduğunu belirtmektedir (12, 76).

#### **2.4.4. Spermatogenez**

Spermatogenez olayında kritik öneme sahip sertoli hücreleri testiküler cinsiyetin erkek yönünde gelişimini sağlar (65). Bazal laminadan seminifer tübüle kadar uzanan sertoli hücreleri spermatogenez olayında yer alan germ hücreleri ile etkileşim halindedir. Sertoli hücreleri birbirleri arasında güçlü bağlantılar oluşturmaktadır. Bu bağlantılar kan – testis bariyerini meydana getirir. Sertoli hücreleri ayrıca inhibin hormonu sentezleyerek ön hipofiz bezinden gonadotropin salgısını baskılar (12, 76).

Spermatogenez puberteyle başlar ve ön hipofizden gonadotropik hormonlarının uyarısı sonucunda seminifer tübüllerde gerçekleşir. Puberte erkeklerde yaklaşık on üç yaşında başlar ve yaşam boyu devam eder, ancak yaşın ilerlemesiyle ciddi anlamda azalır. Spermatogenez olayı testosteron varlığı ile gerçekleşen kompleks bir olaydır ve puberte başlangıcından canlılığın sonuna kadar devam etmektedir (79). Yapılan çalışmalar serum FSH düzeyinin normalden yüksek olduğu bireylerde testiste gerçekleşen spermatogenezin aksadığını ortaya koymuştur (80). Spermatogenezin yani olgun sperm hücresi üretimi spermatositogenez ve spermiyogenez şeklinde iki temel evrede gerçekleşir. Şekil 2.7.'de de gösterildiği gibi ilk evrede, spermatogonyumlar sertoli hücreleri arasından seminifer tübül lümenine doğru sıkı bağlantı noktasını da aşarak ilerler. Spermatositogenez evresinde olan spermatogonyumların bu ilerleyişinde sertoli hücreleri tarafından gerekli fiziksel ve besinsel destek sağlanır. Spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirir ve büyük bir değişim evresine girer. Mitoz bölünme sonrası oluşan hücre birincil spermatosit adını alır. Her birincil spermatosit mayoz bölünme sonucu iki adet ikincil spermatosit oluşturur. Ardından ikincil spermatositler de mayoz bölünmeye uğrar ve dört adet spermatid

meydana getirir. İkinci evrede spermatidler olgunlaşarak sperm hücrelerini meydana getirir. Spermatidler başlangıçta fonksiyonel bir işleve sahip değildir. Birkaç gün içerisinde spermatidlerde kuyruk oluşumu, akrozom ve nükleus gelişimi gerçekleşerek spermatogenez tamamlanır (12, 65).



Şekil 2.7. Spermatogenez aşamaları (65).

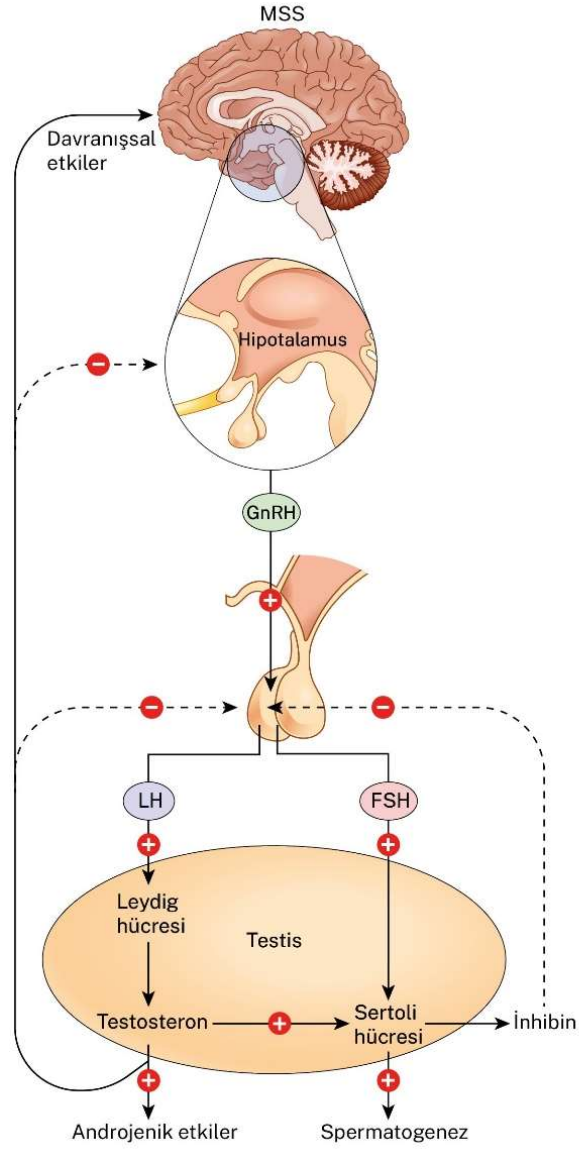
Spermatogenez sonucu oluşan olgun spermatid hücrelerinde kuyruk oluşumu meydana gelir ancak bu hücrelerin hareket yetenekleri kısıtlıdır. Olgun spermatidler epididimiste birkaç gün depo edilir ve hareket yeteneği kazanırlar. Hareket yeteneği kazanan bu hücrelere artık spermatozoon adı verilir (70, 81). Olgun bir sperm baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur. Baş bölgesinde sperm hücrelerine ait genetik bilgiyi taşıyan nükleus bulunur. Sperm hücrelerinin boyun kısmı hücrenin enerji deposu olarak işlev görür. Kuyruk kısmı ise yapısındaki siller sayesinde oosite doğru hareketi sağlar. Sperm kalitesinin en önemli göstergeleri; sperm sayısı, canlılığı ve ilerleyici hareketliliğidir. Sperm ilerleyici hareketliliği oosite giden yolda spermatozoon hareketi için gereklidir (24, 50).

## 2.5. Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks

Sağlıklı erkeklerde pubertenin başlaması ve üreme fonksiyonlarının gelişiminde görev alan hipotalamus, hipofiz bezi ve testisler koordineli bir biçimde çalışır. Bu sistemin her bir bileşeni geri bildirim mekanizmaları ile dengelenir (82). Üreme fizyolojisinin temelinde yer alan bu mekanizma erkeklerde HHT aksı olarak nitelendirilmektedir. Dolayısıyla, HHT aksında meydana gelebilecek bir aksaklık bazı endokrinolojik bozukluklara, jinekolojik problemlere veya infertiliteye neden olabilir (82, 83).

Hipotalamustan salgılanan ve pubertenin başlamasını sağlayan GnRH hormonu ön hipofiz bezinden FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını uyarır (Şekil 2.8.). Uyarılan ön hipofiz bezinden salgılanan FSH hormonu sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezi başlatır. Ön hipofizden salgılanan LH hormonu ise testislerde Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgısını artırır. Testosteron negatif geri bildirim yoluyla GnRH sekresyonunu baskılar, böylece LH ve FSH salgısının düzenlenmesini sağlar. Ayrıca testiste yer alan sertoli hücrelerinden inhibin adı verilen glikoprotein salgısı gerçekleşir. Spermatogenezin baskılanması gerektiğinde salgılanan inhibin ön hipofiz bezi üzerinde güçlü inhibitör etkiye sahiptir. İnhibin ön hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH hormonlarını negatif geri bildirim etkisiyle baskılar (64, 76).

Hipogonadizm genetik nedeni tam olarak ortaya konamamış olan ve hipofizden gonadotropin salgılanmasındaki bozukluk sonucu ortaya çıkan klinik bir tablodur. LH ve FSH salgısı yetersiz veya eksik olması nedeniyle, testisin Leydig hücresinden testosteron salgısı ve sertoli hücresinden de spermatogenez sekteye uğramaktadır (84). Bu hastalıkla dünyaya gelen bireyler puberte yaşına geldiğinde sağlıklı bir şekilde puberteye giremez ve sekonder seks karakterleri gelişmez. Hastalarda genellikle infertilite problemi gözlemlenir. Cinsel gelişim bozukluğunun yanı sıra; kas-iskelet sistemi bozukluğu, osteoporoz, anormal vücut yağ dağılımı, anemi ve psikiyatrik bozukluklar gibi birçok organ ve sistemi etkileyen komplikasyonlar görülmektedir (84).



Şekil 2.8. Hipotalamus – hipofiz – testiküler aks (65).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan onayla (10.03.2020 tarih, 2020/4-3 sayılı karar), İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ile Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### 3.2. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi ve Hayvanların Temini

Deneylerde kullanılacak hayvanların sayısı; hayvanların deneye başlama ağırlık ortalaması yaklaşık 300 gr, standart sapması 25 gr, %4 sapma, tip 1 hata ( $\alpha$ ) 0.05 ve tip 2 hata ( $\beta$ ) (Güç=0.80) olduğunda hayvanların 4 gruba ayrılması durumunda her bir grupta en az 10 hayvanın olması gerektiği güç analizi (Power Analiz) ile belirlendi. Araştırma kapsamında ihtiyaç duyulan 40 hayvanının (*Sprague Dawley* ırkı erkek sıçan) temini İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Üretim ve Araştırma Merkezinden sağlandı. Gruplar aynı gün doğumlu hayvanlardan oluşturuldu.

#### 3.3. Deneysel Hayvanlar ve Grupların Oluşturulması

Deneyde kullanılan sıçanlar deneye başlangıç günü itibariyle tekli kafeslere yerleştirildi. Tekli barındırma ortamı hayvanlarda stres oluşturacağından sıçanların 7 gün boyunca tekli yaşam koşullarına ve kafes stresine adapte olmaları sağlandı. Bu sürenin sonunda sıçanlar 4 gruba ayrıldı (n=10). Deney süresince tüm gruplar,  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık koşullarının sağlandığı ortamda barındırıldı ve tüm gruplar standart sıçan yemi ile beslendi. Gruplar aşağıda belirtildiği gibi oluşturuldu.

**1. Grup (Kontrol):** Deney boyunca bu grupta yer alan sıçanlara hiçbir uygulama yapılmadı. Deney bitiminde (28.gün) sıçanlar dekapite edilerek hipotalamus, kan ve epididimis dokuları toplandı. Toplanan hipotalamus dokusundan reel time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ve Western Blot analiz yöntemleri kullanılarak GnRH protein düzeyi belirlendi. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum FSH,

LH ve testosteron hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan epididimis dokusu tartılarak ağırlıkları, spermiyogram analiz yöntemi ile de sperm yoğunluğu, hareketliliği ve ileri hareketi belirlendi.

**2. Grup (Sham):** Deney başlangıcından 1 hafta sonra (7.gün) lateral ventriküle beyin infüzyon kiti (BİK) (Alzet brain infusion kit 1, ABD) yerleştirilerek 1 hafta iyileşmesi beklendi. Bu süre zarfında günlük intramüsküler analjezik (180 mg/kg Parasetamol) ve antibiyotik (70 mg/kg penisilin) uygulaması yapıldı. Deneyin 14. günü sıçanlar yeniden anesteziye alınarak BİK'in kanülüne Alzet 2ML2 model ozmotik mini pompa (OMP) bağlanıp 14 gün süreyle yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS; çözücü) infüzyonu yapıldı (120 µl/gün). Deney bitiminde (28.gün) sıçanlar dekapite edilerek hipotalamus, kan ve epididimis dokuları toplandı. Toplanan hipotalamus dokusundan RT-PZR ve Western Blot analiz yöntemleri kullanılarak GnRH protein düzeyi belirlendi. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan epididimis dokusu tartılarak ağırlıkları, spermiyogram analiz yöntemi ile de sperm yoğunluğu, hareketliliği ve ileri hareketi belirlendi.

**3. Grup (34 nM Asprosin):** Deney başlangıcından 1 hafta sonra (7.gün) lateral ventriküle BİK yerleştirilerek 1 hafta iyileşmesi beklendi. Bu süre zarfında günlük intramüsküler analjezik (180 mg/kg Parasetamol) ve antibiyotik (70 mg/kg penisilin) uygulaması yapıldı. Deneyin 14. günü sıçanlar yeniden anesteziye alınarak BİK'in kanülüne Alzet 2ML2 model OMP bağlanıp 14 gün süreyle 34 nM asprosin infüzyonu yapıldı (120 µl/gün). Deney bitiminde (28.gün) sıçanlar dekapite edilerek hipotalamus, kan ve epididimis dokuları toplandı. Toplanan hipotalamus dokusundan RT-PZR ve Western Blot analiz yöntemleri kullanılarak GnRH protein düzeyi belirlendi. Alınan kan dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan epididimis dokusu tartılarak ağırlıkları, spermiyogram analiz yöntemi ile de sperm yoğunluğu, hareketliliği ve ileri hareketi belirlendi.

**4. Grup (68 nM Asprosin):** Deney başlangıcından 1 hafta sonra (7.gün) lateral ventriküle BİK yerleştirilerek 1 hafta iyileşmesi beklendi. Bu süre zarfında günlük intramüsküler analjezik (180 mg/kg Parasetamol) ve antibiyotik (70 mg/kg penisilin) uygulaması yapıldı. Deneyin 14. günü sıçanlar yeniden anesteziye alınarak BİK'in kanülüne Alzet 2ML2 model OMP bağlanıp 14 gün süreyle 68 nM asprosin infüzyonu yapıldı (120 µl/gün). Deney bitiminde (28.gün) sıçanlar dekapite edilerek hipotalamus, kan ve epididimis dokuları toplandı. Toplanan hipotalamus dokusundan RT-PZR ve Western Blot analiz yöntemleri kullanılarak GnRH protein düzeyi belirlendi. Alınan kan

dokuda ELISA yöntemi kullanılarak serum FSH, LH ve testosteron hormon düzeyleri belirlendi. Toplanan epididimis dokusu tartılarak ağırlıkları, spermiyogram analiz yöntemi ile de sperm yoğunluğu, hareketliliği ve ileri hareketi belirlendi.

### 3.4. Deney Hazırlıkları

#### 3.4.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

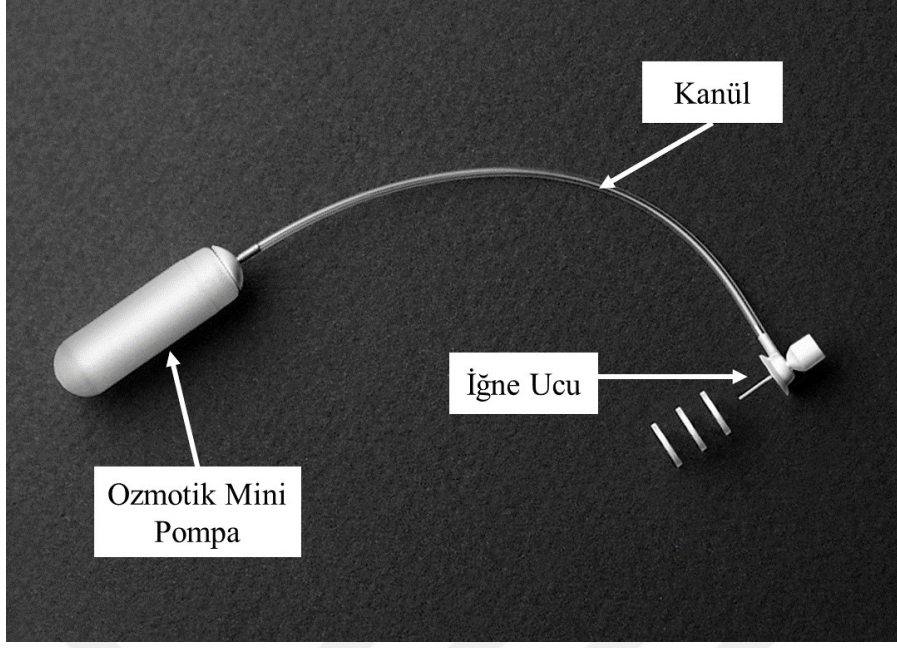
yBOS Tablo 3.1.'de içerikleri gösterilen A ve B solüsyonları 500'er ml steril distile su içerisinde iki farklı solüsyon olarak hazırlandı. Sonrasında hazırlanan A ve B solüsyonları eşit oranlarda karıştırılarak yBOS elde edildi. Hazırlanan yBOS sıvısının sterilizasyonunu sağlamak için 0.22 µm por çapına sahip filtre kullanıldı.

**Tablo 3.1.** yBOS solüsyon içeriği (85).

| Solüsyonlar | İçerik   | Gram  |
|-------------|--|-------|
| A solüsyonu | NaCl   | 8.66  |
|             | KCl  | 0.224 |
|             | CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O                | 0.206 |
|             | MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                | 0.163 |
| B solüsyonu | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O | 0.214 |
|             | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O  | 0.027 |

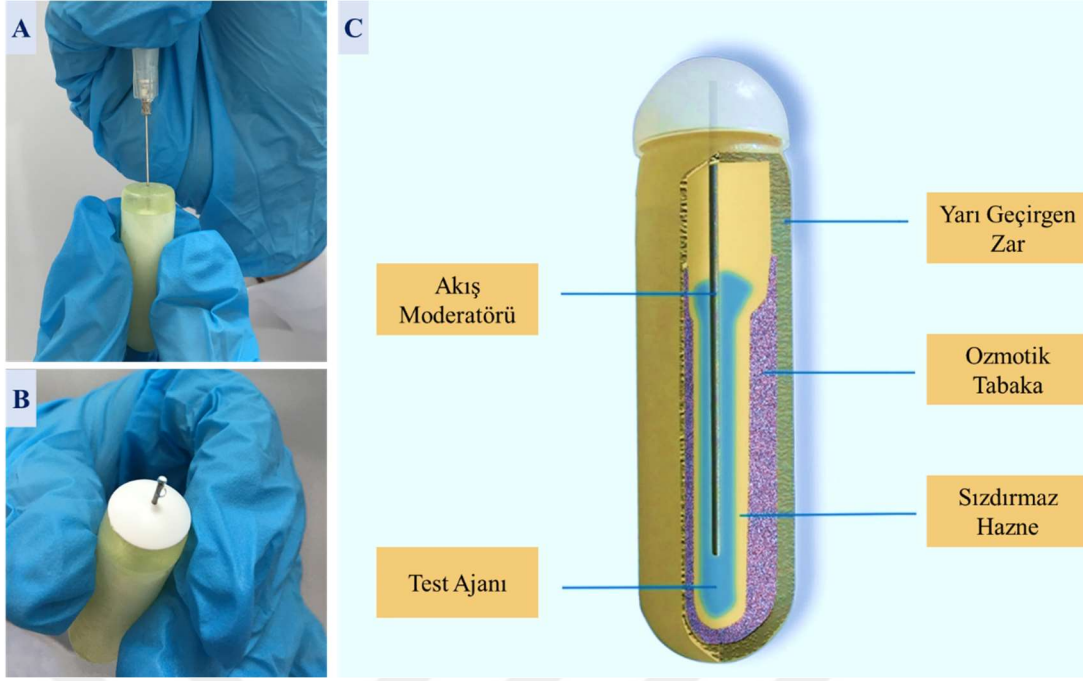
#### 3.4.2. Beyin İnfüzyon Kitlerinin ve Ozmotik Mini Pompaların Hazırlanması

Sıçanların sağ lateral ventrikülüne infüzyon (vertikal eksen için iğne uzunluğu 4.8 mm) yapılabilmesi için BİK kullanıldı. Kitlerin içeriğinde bulunan özel kanüller beyin infüzyon kitine takıldı (Şekil 3.1.). Kanüllerin içerisine hava kabarcığı kalmayacak biçimde infüze edilecek sham grubu için yBOS, deney grupları için hazırlanan 34 ve 68 nM asprosin maddeleri dolduruldu. Kanülün serbest kalan diğer ucu ısıtılmış bir pens ile kapatıldı. Bu işlemin yapılma amacı; içerisi doldurulan kanüllere hava girişinin olmaması ve içinde bulunan sıvının boşalmaması için yapıldı.



**Şekil 3.1.** Beyin infüzyon kiti ve ozmotik mini pompa.

Asprosin (Biolegend, USA) konsantrasyonlarını hazırlama işlemi biyolojik emniyet kabini içinde gerçekleştirildi. Hormon steril yBOS içerisinde çözüldükten sonra asprosin konsantrasyonları uygulama grupları için 34 ve 68 nM olacak bir biçimde hazırlandı. Çalışmada kullanılan OMP'ler 5 µl/saat/14 gün infüzyon yapabilme özelliğine sahiptir (Şekil 3.1.). OMP'ler steril kabin içerisinde hazırlanan hormon konsantrasyonları ve yBOS ile pompa seti içerisinde yer alan ucu künt iğne kullanılarak dolduruldu (Şekil 3.2A). Sonrasında pompa seti içerisinde yer alan metal kanüllü kapak, pompa içerisine yerleştirildi (Şekil 3.2B). OMP, pompa içindeki ozmotik tabaka ile pompanın implante edildiği doku ortamı arasındaki ozmotik basınç farkı sonucu çalışır. Osmotik tabakanın yüksek ozmolalitesi, pompanın dış yüzeyini oluşturan yarı geçirgen bir zardan pompaya akmasını sağlar. Pompaya doldurulan test ajanı (madde/ilâç vb.) ozmotik katmana girerken, sızdırmaz esnek hazneyi sıkıştırarak pompadan vücuda 5 µl/saat/14 gün infüzyon yapar (Şekil 3.2C).



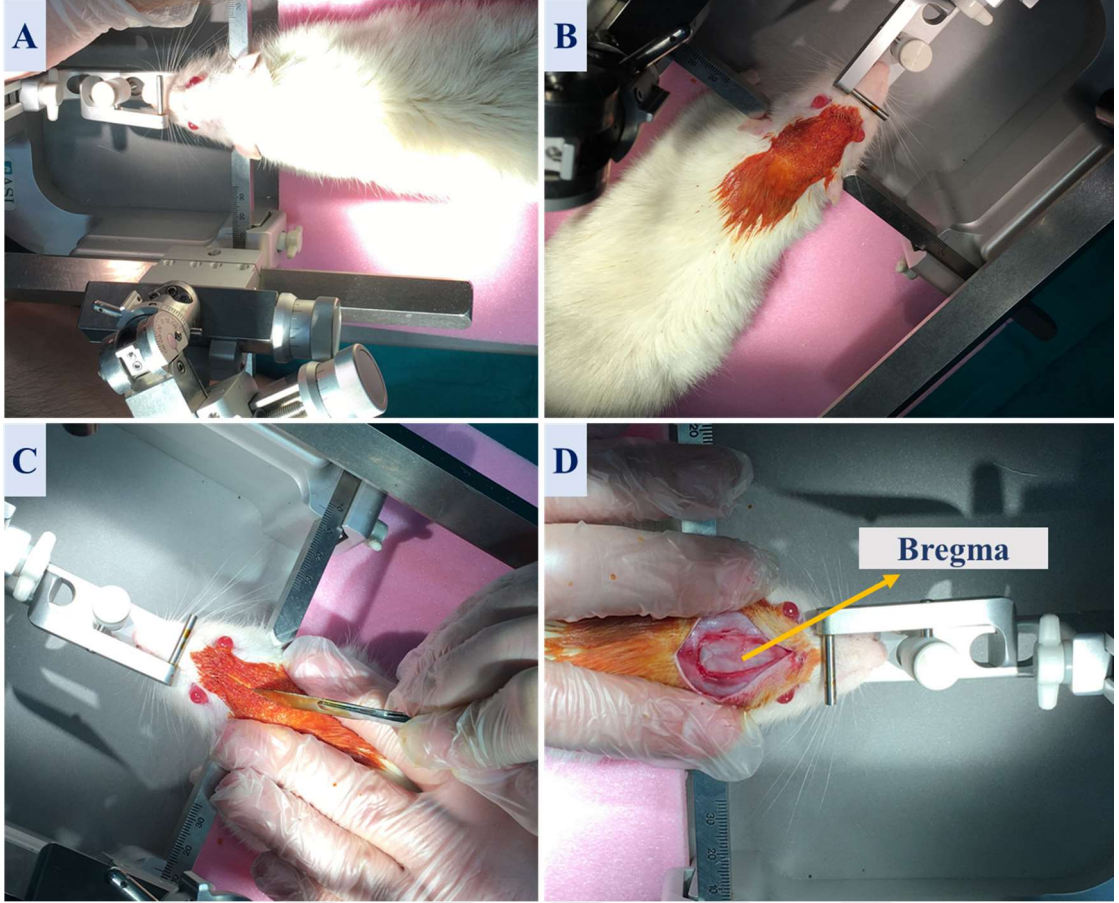
**Şekil 3.2.** OMP'nin doldurulması (A), pompa setinde yer alan metal kanüllü kapağın pompa içerisine yerleştirilmesi (B), OMP'nin iç yapısı ve çalışma prensibi (C).

### 3.4.3. Sıçanların Operasyona Hazırlanması

Operasyon öncesi ameliyathane ortamı UV-C ışın ile, her sıçana özel olarak hazırlanan cerrahi aletler ise otoklav yardımıyla steril hale getirildi. Yeterli miktarda steril eldiven temini yapıldı. Sıçanları anestezi altına alabilmek için intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya) ve 8 mg/kg ksilazin (Alfazyne, Hollanda) kullanıldı. Sıçanların anestezi altına girdiklerinin tespiti için fizyolojik yanıt ve parmak kıstırma yanıtları izlendi. Anesteziye girdiği belirlenen sıçanların kafa derileri tıraş edilip operasyona hazırlık yapıldı.

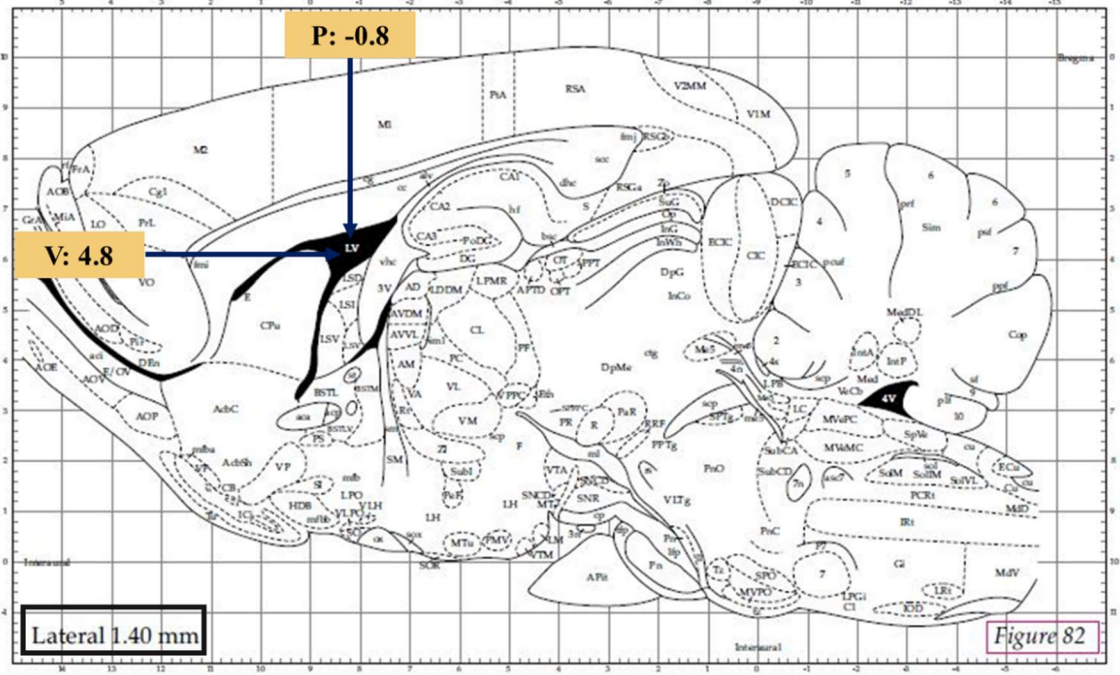
### 3.5. Hayvanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi ve BİK İmplantasyonu

Sıçanlar stereotaksik cihaza (Rodent Stereotaxic Instruments, Harvard Apparatus, ABD) kulaklarından ve ağız kısmından kafatası yere tam paralel olacak şekilde sabitlendi (Şekil 3.3A), tıraş edilen bölgeye %10 povidon iyodin sürülerek (Şekil 3.3B) kafatası derisi bistüri ile kesildi ve kemik yapıya ulaşıldı (Şekil 3.3C). Kemik yüzeyi temizlenerek bregmanın açık bir şekilde görülmesi sağlandı (Şekil 3.3D).



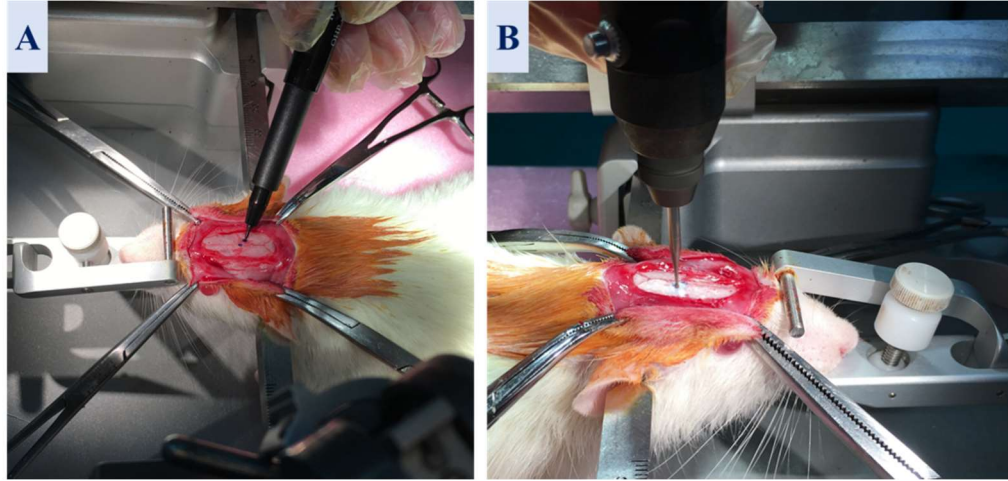
**Şekil 3.3.** Sıçanların stereotaksik cihaza sabitlenmesi (A), kesi bölgesine povidon iyodin sürülmesi (B), kafa derisinin kesilerek kemik dokuya ulaşılması (C) ve bregma noktasının belirlenmesi (D).

Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (86). Lateral ventrikül giriş noktası, referans noktası olarak seçilen bregmadan 1.40 mm lateral, 0.8 mm posteriyor (kaudal) ve 4.8 mm vertikal gidilerek tespit edildi (Şekil 3.4.).



**Şekil 3.4.** Sıçan beyin atlası referans alınarak belirlenen lateral ventrikül koordinatları (86).

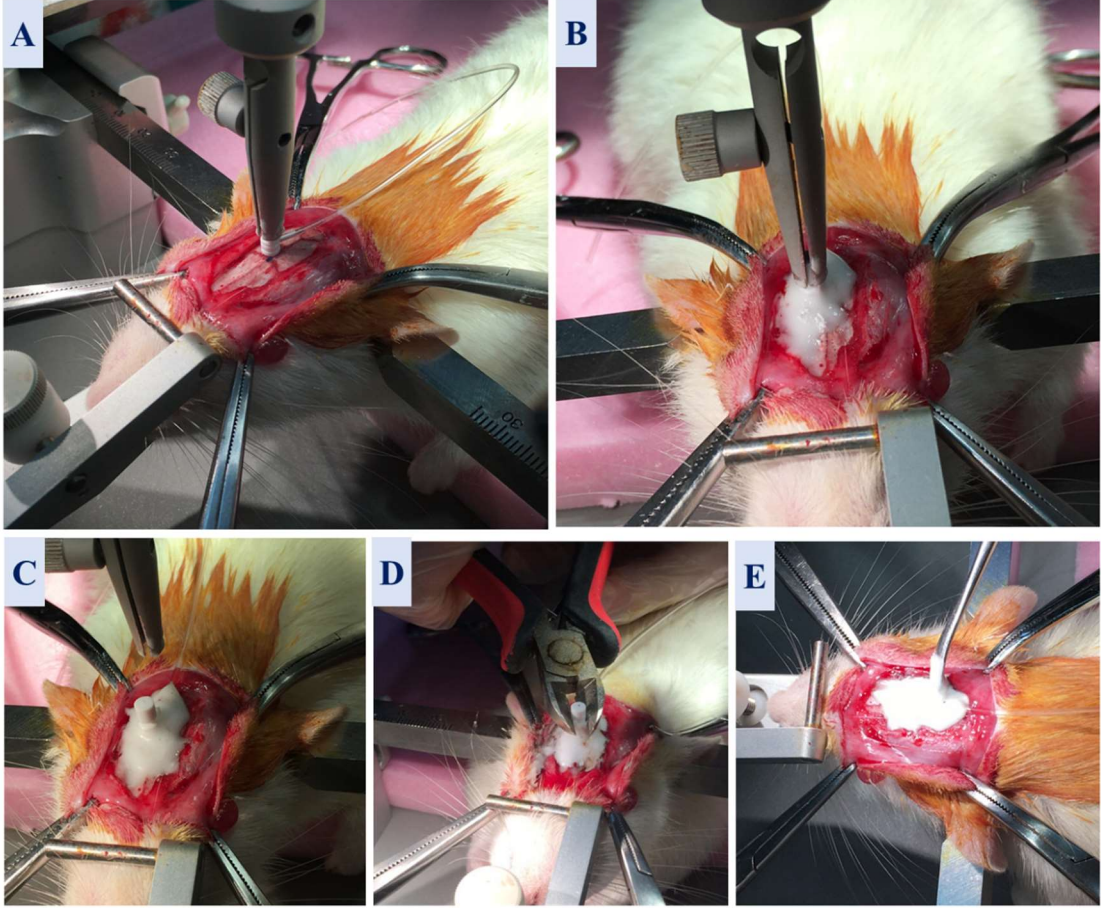
Belirlenen nokta BİK yardımıyla işaretlendi (Şekil 3.5A) ve işaretlenen nokta matkap ile duraya zarar vermeden delindi (Şekil 3.5B).



**Şekil 3.5.** Lateral ventrikül için delinecek bölgenin işaretlenmesi (A) ve matkapla delinmesi (B).

Kalıcı kanül, BİK üzerindeki plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihaza takılmış olan özel Alzet tutucusuna yerleştirildi ve delinen bölgeden lateral ventriküle indirildi (Şekil 3.6A). BİK'ler diş yapıştırıcısı (dental cement) yardımıyla kafatasına

sabitlendi (Şekil 3.6B), Alzet tutucusu dikkatli bir şekilde çıkarıldı (Şekil 3.6C), mini yan keski yardımıyla BİK'in plastik başı kesildi (Şekil 3.6D) ve üzeri dental cement ile kapatıldı (Şekil 3.6E).



**Şekil 3.6.** Beyin infüzyon kitinin delinen kısımdan lateral ventriküle indirilmesi (A), kanül etrafının dental cement ile yapıştırılması (B), Alzet tutucunun çıkarılması (C), kanül başının kesilmesi (D) ve diş yapıştırıcısıyla kaplanması (E).

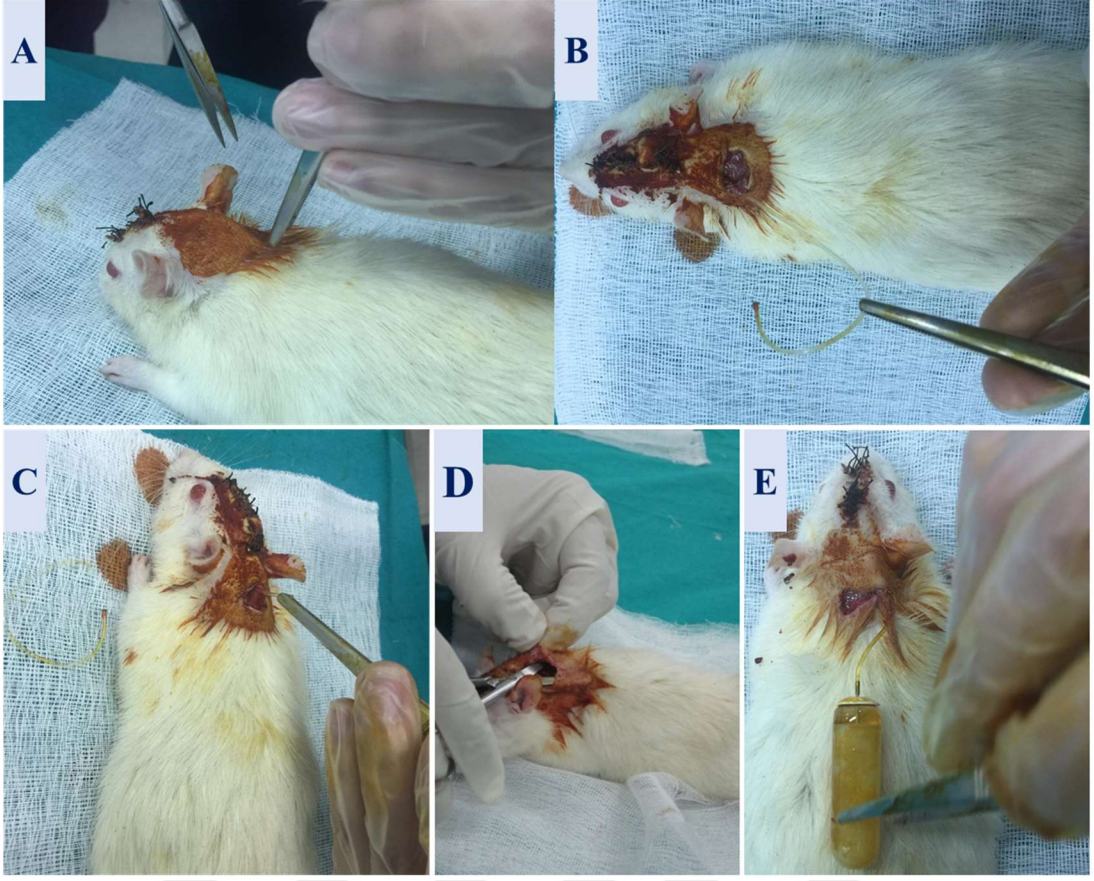
BİK'in kanülü hayvanların ense derisi altına yerleştirildi ve insizyon bölgesi 3.0 ipek iplik (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Trabzon/Türkiye) ile dikilerek insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürüldü. Ayrıca sıçanlardaki kanamaya bağlı olarak meydana gelen sıvı kaybını önlemek amacıyla 500 µl serum fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Operasyona bağlı olarak hayvanlarda gelişebilecek ağrı duyusunun çalışmayı olumsuz etkilememesi ve insizyon bölgesinin iyileşmesi için ve 1 hafta süresince peptid infüzyonu gerçekleştirilmedi. Operasyondan sonraki ilk hafta sıçanların kesi bölgesine düzenli olarak pansuman yapıldı. Ayrıca operasyona bağlı gelişebilecek ağrı ve enfeksiyonlara karşı hayvanları korumak amacıyla ilk 3 gün intramüsküler olarak

analjezik (Parasetamol; 180 mg/kg) ve antibiyotik (Penisilin; 50 mg/kg) uygulamasına devam edildi.

### 3.6. Ozmotik Mini Pompaların Yerleştirilmesi

7. günün sonunda sıçanların spontan solunumları ve göz kırpmaya refleksleri korunacak şekilde intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin, 8 mg/kg ksilazin uygulandı. Spontan hareketleri kaybolan sıçanların ense kısmında kanülün yeri palpe edilerek belirlendi ve bu kısım tıraş edildikten sonra dezenfekte edilerek ense kısmına küçük bir kesi açıldı (Şekil 3.7A). Daha önceden hayvanlara yerleştirilen beyin infüzyon kitinin kanülüne ulaşıldı (Şekil 3.7B). Hamilton enjektörü kullanılarak kanülde tıkanma olup olmadığı kontrol edildi ve herhangi bir tıkanmayla karşılaşmadı. Önceden OMP'ler infüze edilecek maddelerle doldurularak hazırlandı (sham için yBOS, uygulama grupları için 34 ve 68 nM asprosin). Kanülün fazla kısmı kesildi ve OMP'nin takılabileceği uzunlukta kanül bırakıldı (Şekil 3.7C). Ense derisi genişletilerek pompanın yerleştirilebileceği bir alan oluşturuldu (Şekil 3.7D) ve OMP BİK'e bağlanarak infüzyon başlatıldı (Şekil 3.7E).

İnsizyon bölgesi 3.0 ipek iplik (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş., Trabzon/Türkiye) ile dikildi ve insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürüldü. Operasyona bağlı olarak hayvanların ağrılarını azaltmak amacıyla sıçanlar anestezi etkisi kalkmadan analjezik ilaç (Parasetamol, 180 mg/kg) ip uygulandı. Ayrıca operasyona bağlı meydana gelebilecek sıvı kaybını tolere etmek amacıyla sıçanlara ip 500 µl SF uygulaması yapıldı.



**Şekil 3.7.** Sıçanların ense derisinde bulunan kanülün tespit edilmesi (A) ense derisine açılan kesiden kanül ucunun çıkartılması ve kanül ucunun çıkartılarak kontrol edilmesi (B), kanülün fazla kısmının kesilmesi (C), ense derisinin genişletilmesi (D) ve OMP takılarak infüzyonun başlatılması (E).

### 3.7. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması

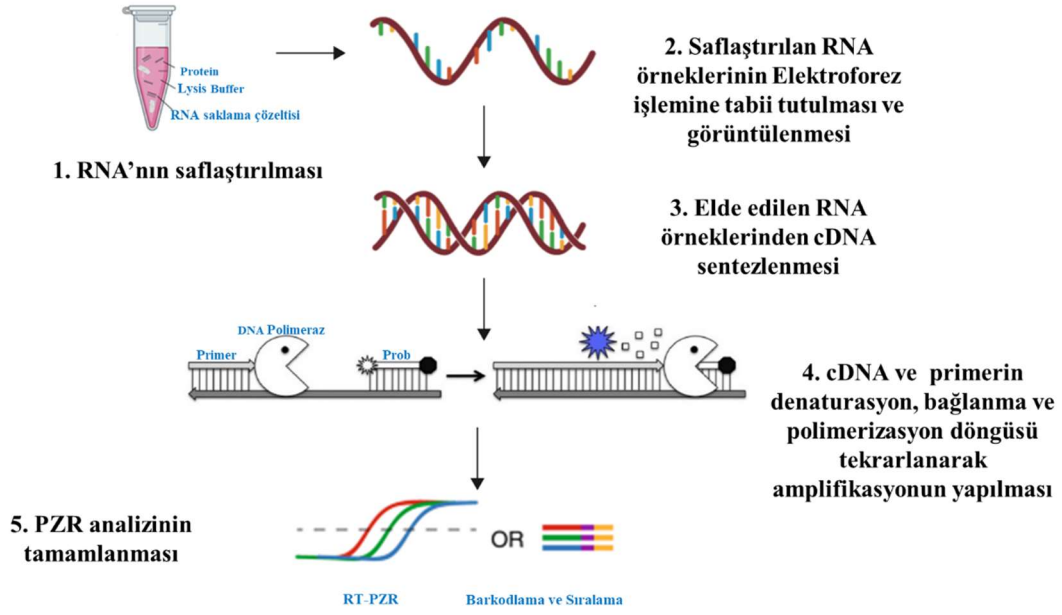
İnfüzyon süresi bitiminden 10 saat önce tüm gruplardaki hayvanların yemleri kafeslerinden alınarak sıçanlar aç bırakıldı. Ardından tüm hayvanlar anestezi/trankilizan altında dekapite edildi. Beyin (hipotalamus), kan ve epididimis dokuları alındı. Kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edilerek serumları ayrıldı. Serumlar hormon ve biyokimyasal analizler yapıncaya kadar derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edildi. Beyin doku örnekleri RT-PZR ve Western Blot, epididimis dokusu ise spermiyogram analizleri yapıncaya kadar -80 °C'de bekletildi.

### 3.8. Analizlerin Yapılması

#### 3.8.1. RT-PZR Analizleri

Deney gruplarından hipotalamusta bulunan GnRH mRNA seviyelerinin tespiti için alınan doku örnekleri buz üzerinde küçük parçalar halinde kesilerek RNA saklama çözültisi içine konuldu ve bu dokulardan toplam RNA eldesi “EZ-10 Spin Column Total RNA Miniprep Kit” (BioBasic, Kanada) kullanılarak yapıldı.

Önce 25 mg doku tartıldı ve sonrasında izolasyon kiti ile birlikte gelen lizis solüsyonundan 0.45 ml tüpler içerisinde konuldu. Örnekler boncuklu homojenizatörde 2 dk homejenize edildi. Tüpler üzerine lizis solüsyonunun yarısı hacimde etanol eklendi ve ependorf tüpler elle alt üst edilerek karıştırıldı. Tüpler içerisinde bulunan bütün karışım 2 ml’lik spin kartüj içeren koleksiyon tüplerine alındı ve tüpler oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12000 × g’de santrifüj edildi. Kolona 0.5 ml “RW Solüsyonu” eklendi ve sonrasında oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12000 × g’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama tüpünün altında kalan sıvı boşaltıldı. 0.5 ml “Universal RPE Soluon” eklenen kolonlar, oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12000 × g’de santrifüjlendi ve yine tüplerin altında kalan sıvı kısım atıldı. Bu aşama iki defe tekrarlandı ve sonrasında kolon yeni bir ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µl RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dk bekletildi. Tüpler bu süre sonunda 30 saniye boyunca 12000 × g’de santrifüjlendi. Bu işlem sonrasında dokulardaki toplam RNA izolasyonu tamamlandı. Örneklerin total RNA miktarları nanodrop ile A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> nm ölçümleri yapılarak belirlendi. cDNA sentezi için RNA miktarının eşitlenmesi amacıyla en düşük RNA değeri standart alındı. cDNA sentezi için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı.



Şekil 3.8. RT-PZR analiz protokolüne genel bakış.

### cDNA Sentez Protokolü

RNA örneklerden cDNA sentezi iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi için havuz yapılan RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. Sentez için tüplere 10 µl RNA örneği, 4 µl 5X iScript Reaction mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase ve 5 µl nükleaz içermeyen su ilave edildi. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. Cihazın inkübasyon ayarları; 25 °C'de 5 dk, 42 °C'de 30 dk, 85 °C'de 5 dk ve 4 °C'de ∞ olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

### Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-PCR ile amplifiye edildi (BioRad CFX Connect, ABD). Analizlerinde 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı (BioRad, ABD). Analiz için plate hazırlanırken cDNA örneklerinde her bir kuyucuğa 2 µl kondu. Buz üzerinde her bir örnek için 5 µl SYBR Green Master Mix, 2.5 µl nükleaz içermeyen su ve 0.5 µl primer hibridizasyon probu olacak şekilde örnek sayısına göre hesaplanan bileşen miktarları ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Platedeki cDNA örneklerinin üzerine 8 µl hazırlanan karışımdan bırakılarak plate üzeri

optik yapıştırıcı filmle kapatıldı. Gen ifade seviyeleri, BioRad CFX Connect sistemi ile ölçüldü. Çalışmada  $\beta$ -aktin kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Sıcaklık koşulları 50 °C’de 2 dk, 95 °C’de 10 dk X 45 siklüs, 95 °C’de 15 saniye ve 60 °C’de 1 dk olacak şekilde ayarlandı. Real Time-PCR analizleri sonucunda ilgili genlerin mRNA ifadelerindeki değişimler  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemi kullanılarak hesaplandı (87). Deneysel çalışmalar 3 tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

Gen ifadelerinin analizinde kullanılan primerlerin dizilimleri ve büyüklükleri Tablo 3.2.’de verildi.

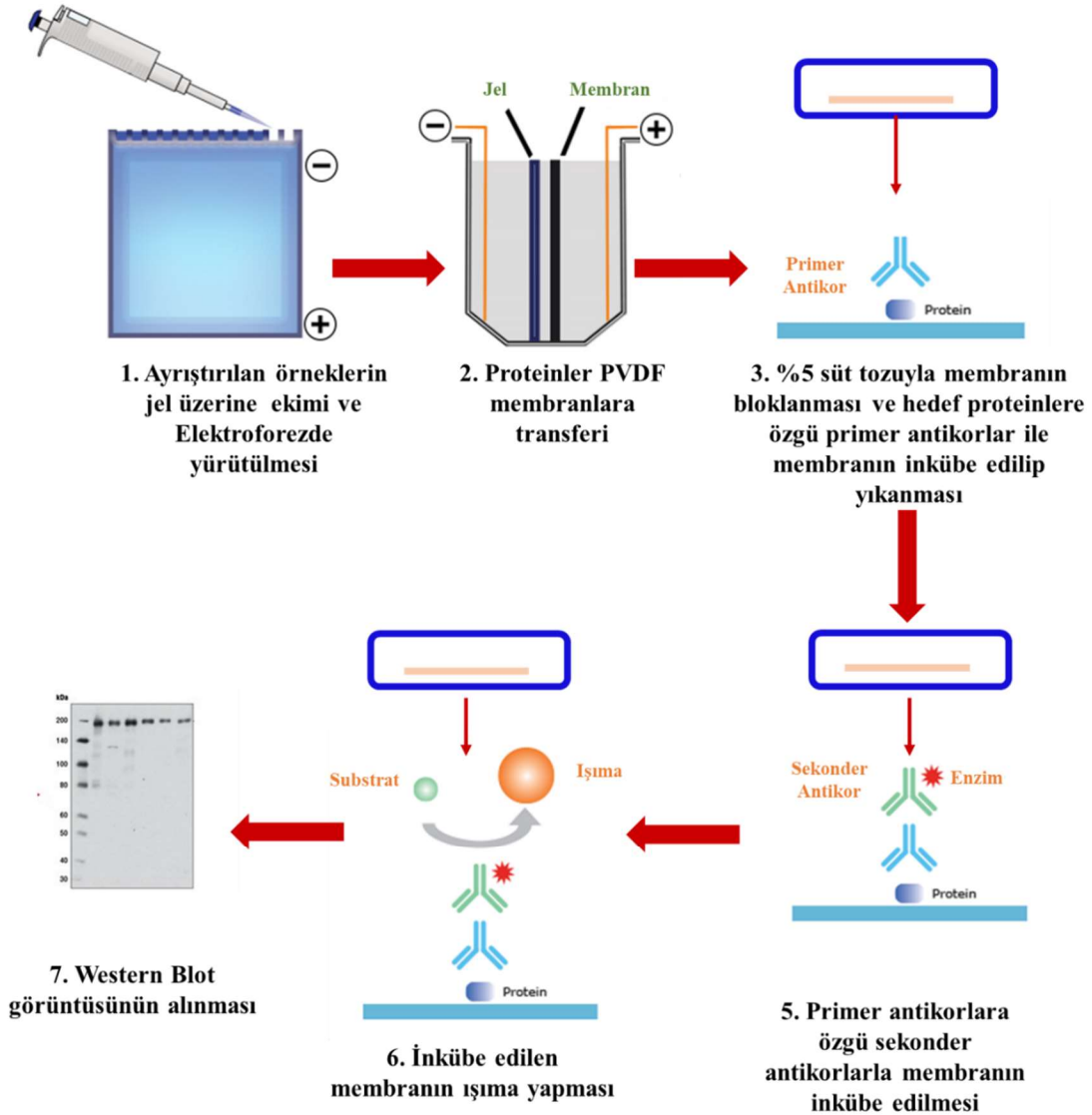
**Tablo 3.2.** Primer dizilimleri.

| <b>GEN ADI</b>                  | <b>Primer dizisi</b>  | <b>NCBI Referens Sekans Numarası</b> | <b>Beklenen Primer PZR ürün büyüklüğü (Amplifikasyon ürünü)</b> |
|---------------------------------|---|--------------------------------------|---|
| <b><math>\beta</math>-aktin</b> | F: 5’<br>CTAAGGCCAACCG<br>TGAAAAG 3’<br>R: 5’<br>GCCTGGATGGCTA<br>CGTACA 3’ | NM_031144.3                          | 76 bp   |
| <b>GnRH</b>                     | F: 5’<br>TCTGCGAGGAGCT<br>CTGGA 3’<br>R: 5’<br>GGCCAGTGCATT<br>ACATCTT 3’   | NM_012767                            | 69 bp   |

### 3.8.2. Western Blot Analizi

Western Blot analizleri Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Sıçanların hipotalamus dokularından GnRH

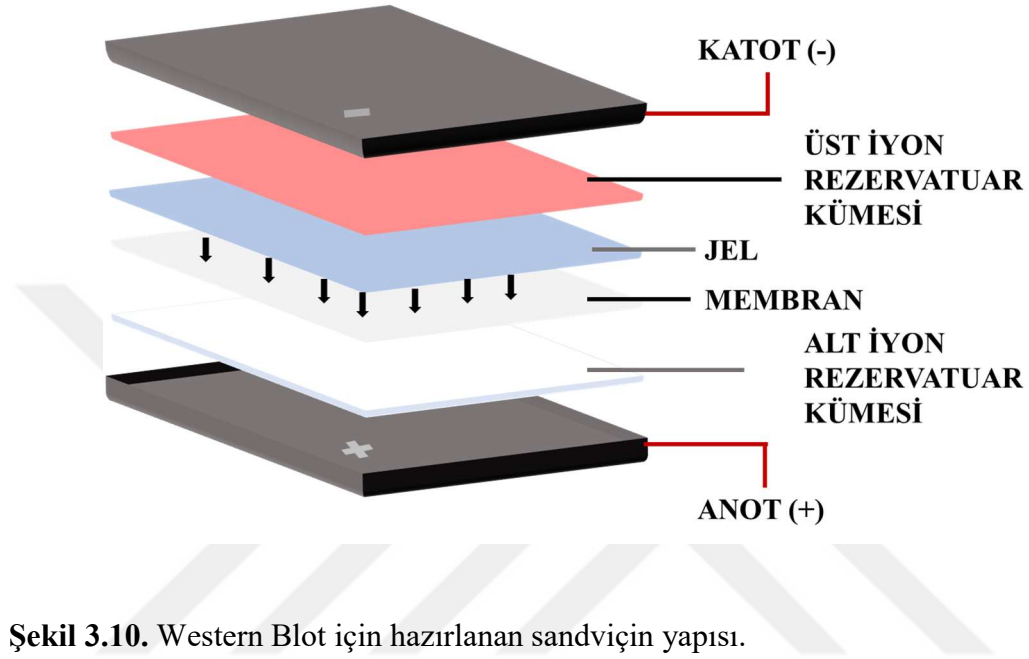
protein seviyeleri Western Blot analiziyle belirlendi. Yapılan Western Blot analizinin genel prosedürü Şekil 3.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Western Blot analizine genel bakış.

Alınan doku örnekleri RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, %0.1 Triton X-100, %0.5 Sodyum deoksikolat, %0.1 SDS, 1 mM Sodyum ortovanadat, 1 mM NaF, cOmplete™ Proteaz inhibitör tablet; Roche) içerisinde homojenatörde (QIAGEN TissueLyser LT, Almanya) parçalandı ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Lizis sonrası 3 defa 10 sn sonikasyon yapıldı (Q125, QSonica, USA). Tüpler 4°C sıcaklıkta 15000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni tüplere alındı ve örneklerin protein düzeyleri BCA Protein ölçüm kiti (Biorbyt, İngiltere) kullanılarak belirlendi.

Çalışmada %15 SDS jeller kullanıldı ve her kuyucuğa eşit miktarda protein örneği (20 µg) yükledi. Jeller 10 dk 100 V'da daha sonra 70 dk 200 V'da yürütüldü. Elektroforez sonrası Trans-Blot Turbo RTA transfer kiti (Katalog No: 1704272, BioRad, ABD) kullanılarak 0.22 µm PVDF membranlara proteinler transfer edildi (TransBlot Turbo, BioRad, ABD) (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Western Blot için hazırlanan sandviçin yapısı.

Membran oda sıcaklığında 1 saat %5'lik süt tozuyla bloklandı ve sonra geceboyu 4 °C'de GnRH primer antikorları ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, membranlar TBS-T ile yıkandı ve oda sıcaklığında 1 saat HRP ile konjüge edilmiş ikincil antikor uygulandı. İnkübasyondan sonra membranlar 3 defa 5 dk süreyle TBT-T ile yıkandı. Son olarak, ECL solüsyonu (Clarity ECL Western Blotting Substrate, BioRad, ABD) ile muamele edilen membranlar, Fusion FX-7 (Vilber, Almanya) sisteminde görüntüledi. Blotların analizi Image J programında analiz edildi. Yükleme kontrolü olarak insan anti- $\beta$ -aktin antikorunu kullanıldı (88, 89). Deneyde ölçülen doku protein seviyesi  $\beta$ -aktin'e oranlandı.

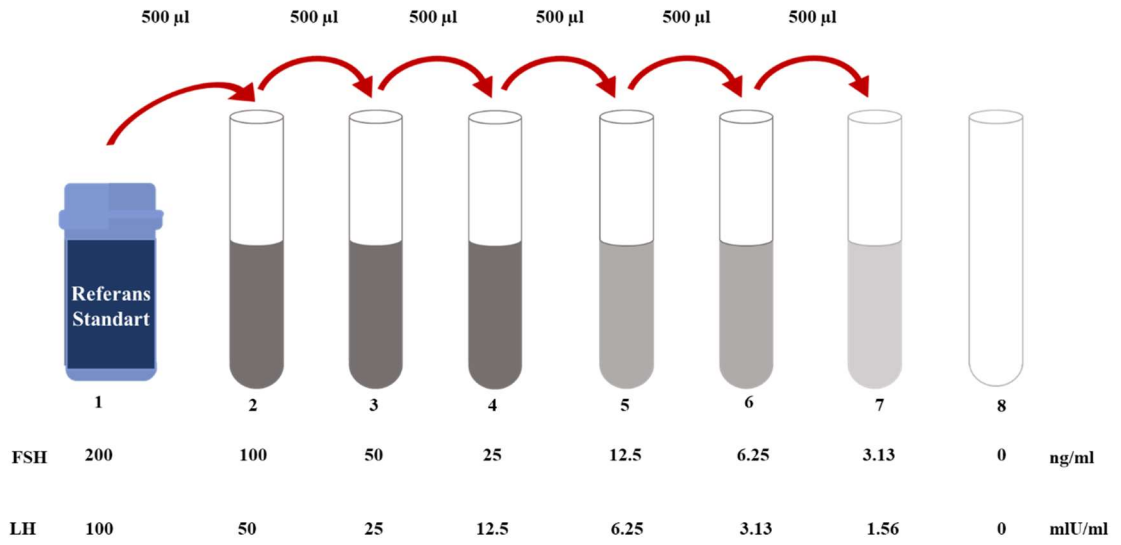
### 3.8.3. Hormon Parametrelerinin Tayini

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında ELISA analizleri yapıldı. Serum LH (Elabscience, E-EL-R0026), FSH (Elabscience, E-

EL-R0391) ve testosteron (Cayman, 582701) seviyelerini belirlemek için sıçan spesifik ELISA kitleri kullanıldı.

### Serum LH ve FSH Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

ELISA kiti içeriğinde yer alan deney protokolü serum LH ve FSH seviyelerini belirlemek için uygulandı. Analizlerin başlangıcında önce Şekil 3.11.'de belirtildiği gibi kit içinde bulunan 100 mIU/ml (LH) ve 200 ng/ml (FSH) konsantrasyonlara sahip standart dilüsyon buffer solüsyonu kullanılarak seyreltildi.



Şekil 3.11. Serum LH ve FSH ELISA standart solüsyonunun dilüe edilmesi.

Hazırlanan standartlar, numuneler, ELISA tamponu ve antikor, 96 kuyucuklu ELISA Kit plağına Şekil 3.12.'de gösterildiği gibi pipetlendi.

|   | 1   | 2   | 3  | 4  | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | S1  | S1  | N1 | N1 | N9  | N9  | N17 | N17 | N25 | N25 | N33 | N33 |
| B | S2  | S2  | N2 | N2 | N10 | N10 | N18 | N18 | N26 | N26 | N34 | N34 |
| C | S3  | S3  | N3 | N3 | N11 | N11 | N19 | N19 | N27 | N27 | N35 | N35 |
| D | S4  | S4  | N4 | N4 | N12 | N12 | N20 | N20 | N28 | N28 | N36 | N36 |
| E | S5  | S5  | N5 | N5 | N13 | N13 | N21 | N21 | N29 | N29 | N37 | N37 |
| F | S6  | S6  | N6 | N6 | N14 | N14 | N22 | N22 | N30 | N30 | N38 | N38 |
| G | S7  | S7  | N7 | N7 | N15 | N15 | N23 | N23 | N31 | N31 | N39 | N39 |
| H | BLK | BLK | N8 | N8 | N16 | N16 | N24 | N24 | N32 | N32 | N40 | N40 |

**Şekil 3.12.** Serum LH ve FSH düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni.

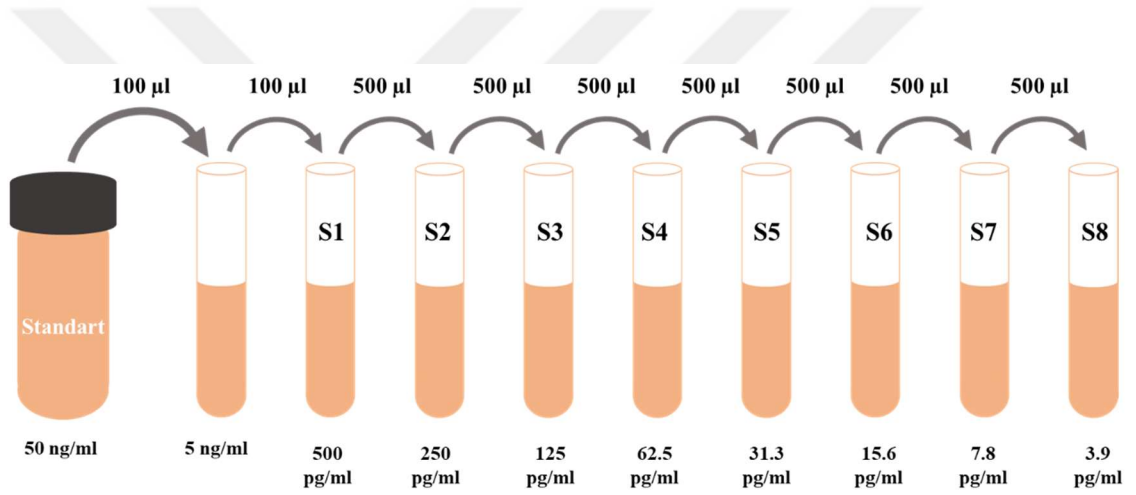
Analiz için kit plağının düzeni sağlandıktan sonra aşağıda belirtilen ELISA analiz protokolü uygulandı.

- Standart, kör (blank) veya örnekler 100 µl hacminde plak düzeninde gösterildiği şekilde pipetlendi. Üzeri yapışkan kapakla kapatıldı.
- Plaka 37 °C’de 90 dk. inkübe edildi ve inkübasyon sonrası 100 µl Biotinylated Detection Ab. Reaktif eklendi. Üzeri yapışkan kapakla kapatıldı ve 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Yapışkan kapak çıkarıldıktan sonra yıkama solüsyonu ile (her kuyucuğa 0.35 ml) plak 3 defa yıkandı. En son yıkamadan sonra plate kağıt havluya ters çevrilerek vuruldu.
- Tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP konjuge solüsyonu eklendi ve üzeri yapışkan kapakla kapatılarak 30 dk. 37 °C’de inkübe edildi.
- Yıkama solüsyonu ile (her kuyucuğa 0.35 ml) plak 5 defa yıkandı. En son yıkamadan sonra plate kağıt havluya ters çevrilerek vuruldu.
- Her kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu eklendi ve plak aliminyum folyoyla sarılarak gün ışığı engellendi. Plak 15 dk. 37 °C’de inkübe edildi.

- Renk değişimini durdurmak için 50 µl stop solüsyonu tüm kuyucuklara eklendi.
- 450 nm dalga boyunda ELISA plate okuyucusunda okuma yapıldı ve FSH sonuçları ng/ml, LH sonuçları mIU/ml olarak hesaplandı.

### Serum Testosteron Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Sıçanların serum testosteron seviyesini belirlemek için ELISA kiti ile birlikte gelen deney protokolü uygulandı. Analizlere başlamadan önce kit içinde bulunan 50 ng/ml konsantrasyona sahip standart, dilüsyon buffer solüsyonu kullanılarak Şekil 3.13.'te belirtildiği gibi seyreltildi.



Şekil 3.13. Serum testosteron ELISA kit standartının dilüe edilmesi.

Hazırlanan standartlar, numuneler, ELISA tamponu ve antikor, 96 kuyucuklu ELISA kit plağına Şekil 3.14.'te gösterildiği gibi pipetlendi.

|   | 1              | 2  | 3  | 4  | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|---|----------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | BLK            | S1 | N1 | N1 | N9  | N9  | N17 | N17 | N25 | N25 | N33 | N33 |
| B | BLK            | S2 | N2 | N2 | N10 | N10 | N18 | N18 | N26 | N26 | N34 | N34 |
| C | NSB            | S3 | N3 | N3 | N11 | N11 | N19 | N19 | N27 | N27 | N35 | N35 |
| D | NSB            | S4 | N4 | N4 | N12 | N12 | N20 | N20 | N28 | N28 | N36 | N36 |
| E | B <sub>0</sub> | S5 | N5 | N5 | N13 | N13 | N21 | N21 | N29 | N29 | N37 | N37 |
| F | B <sub>0</sub> | S6 | N6 | N6 | N14 | N14 | N22 | N22 | N30 | N30 | N38 | N38 |
| G | B <sub>0</sub> | S7 | N7 | N7 | N15 | N15 | N23 | N23 | N31 | N31 | N39 | N39 |
| H | TA             | S8 | N8 | N8 | N16 | N16 | N24 | N24 | N32 | N32 | N40 | N40 |

**Şekil 3.14.** Serum testosteron düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni (S1-8: Standart eklenen kuyucuk, BLK: Boş kuyucuk, N1-40: Serum numunesi, NSB: Spesifik olmayan bağlayıcı, B<sub>0</sub>: Maksimum bağlayıcı, TA: Total aktivite).

Analiz için kit plağının düzeni sağlandıktan sonra aşağıda belirtilen ELISA analiz protokolü uygulandı.

- 50 µl standart ve örnekler ELISA plakına eklendi.
- Her kuyucuğa kit içerisinde gelen 50 µl Biotinilat eklendi.
- Plak 45 dk 37 °C’de inkübe edildi.
- Aspirasyon ve yıkama işlemi 3 defa tekrarlandı.
- Her kuyucuğa kit içerisinde HRP Conjugate’tan 50 µl eklendi.
- Plak 30 dk 37 °C’de inkübe edildi.
- 5 kez aspire ve yıkama işlemi uygulandı.
- 90 µl substrate Reagent eklendi.
- Plak 15 dk 37 °C’de inkübe edildi.
- Renk gelişimini durdurmak için 50 µl stop solüsyonu (tüm kuyucuklara) eklendi.
- 450 nm dalga boyunda ELISA plate okuyucusunda okuma yapıldı ve sonuçlar pg/ml olarak hesaplandı.

#### **3.8.4. Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi**

Hemositometre yardımıyla epididimal sperm konsantrasyonu tespit edildi. İlk olarak petri kabında sağ epididim 1 ml SF içerisinde parçalandı ve çalkalayıcıda 4 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından süpernatant 1:200 oranında seyreltildi. Sonrasında Neubauer sayım lamının iki odacığına da 10 µl seyreltilmiş sperm süspansiyonu eklendi ve oda ısısında 5 dk. inkübasyonda bekletildi. Son basamakta da yerleşik hücreler ışık mikroskobu yardımıyla sayıldı. İleri progresif sperm hareketliliği yüzdesi ise ışık mikroskobu kullanılarak belirlendi. Öncelikle bir slayt 37 ° C'ye kadar ısıtıldı. Üzerine temiz lamalar konuldu ve her biri taze olarak 40 µl semen ve 10 µl eozin solüsyonu karıştırılıp lama yayıldı. Hazırlanan preparat immersiyon yağı kullanılarak 100'lük objektifte, her kesitte 100 sperm hücresi incelenerek sayıldı. Elde edilen veriler yüzde birimiyle gösterildi.

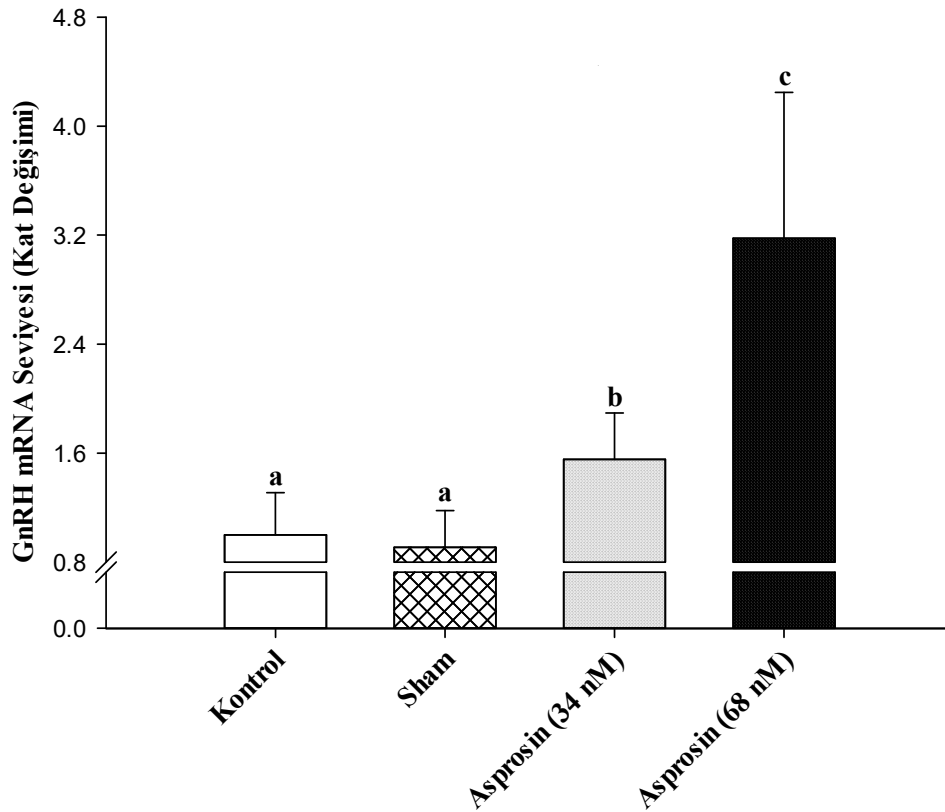
#### **3.8.5. Verilerin İstatistiksel Analizi**

Analizlerde IBM SPSS Statistics 22.0 for Windows paket programı kullanıldı. Nicel veriler ortamala  $\pm$  standart sapma (SS) ile özetlendi. Normal dağılıma uygunluk Shapiro Wilk testi ile incelendi. Nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmalarında Kruskal Wallis H testi kullanıldı. Önemli farklılık belirlendiğinde çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile gerçekleştirildi.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Asprosinin GnRH mRNA Seviyesi Üzerine Etkisi

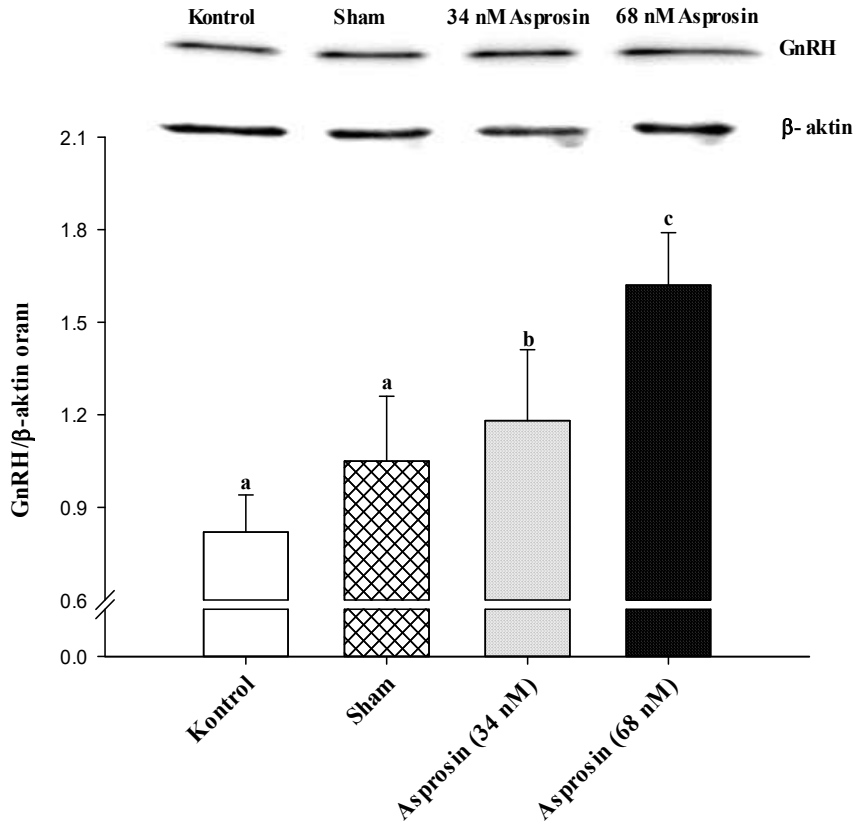
Asprosin uygulamasının hipotalamus dokusundaki GnRH mRNA ifade düzeyinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol ve sham grupları arasında GnRH mRNA seviyeleri açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ), asprosin uygulanan gruplarda, kontrol ve sham gruplarına göre GnRH mRNA seviyesinin arttığı tespit edildi. Ayrıca 68 nM asprosin uygulanan grupta GnRH mRNA seviyesinin 34 nM asprosin uygulanan gruba göre doz bağımlı artış gösterdiği belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.1.** Asprosinin hipotalamus dokusundaki GnRH mRNA ifadesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı;  $a,b,c,p<0.05$ )

## 4.2. Asprosinin GnRH Protein Seviyesi Üzerine Etkisi

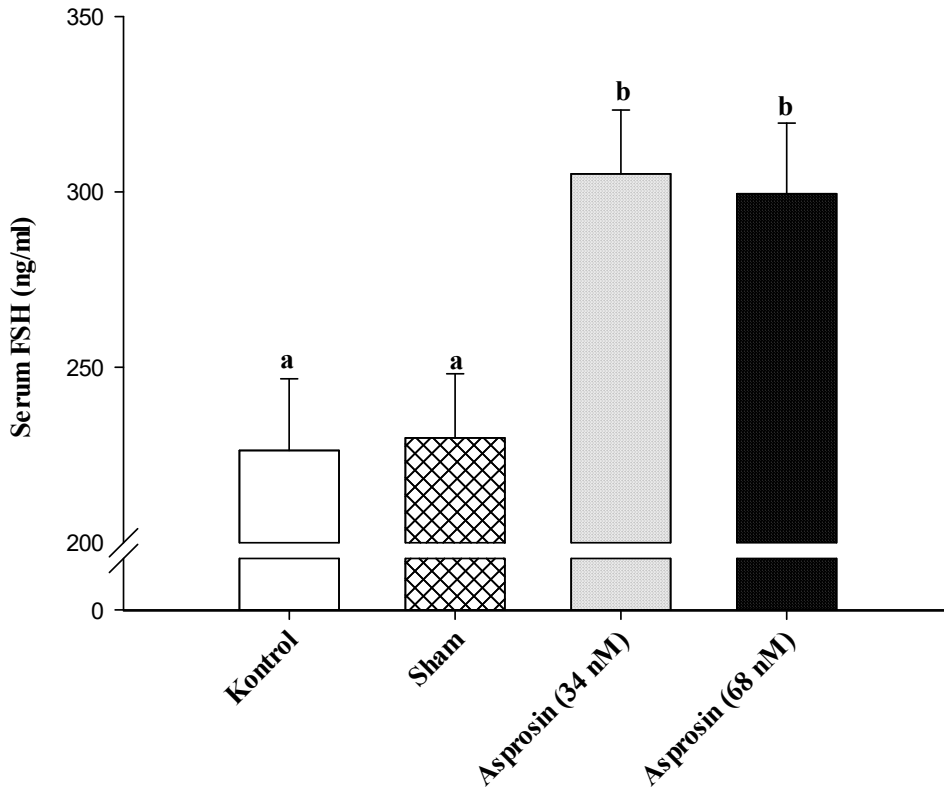
Asprosin uygulamasının hipotalamus dokusundaki GnRH protein ifade düzeyinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol ve sham grupları arasında GnRH protein seviyeleri açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ), ancak asprosin uygulama gruplarında kontrol ve sham gruplarına kıyasla GnRH protein seviyesini arttırdığı, ayrıca bu artışın doz bağımlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.2.** Asprosinin hipotalamus dokusundaki GnRH protein ifadesi üzerine etkisi. Western Blot jel görüntüsü (A) ve GnRH bantlarının densimetrik analizinin gösterilmesi (B). (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı;  $a,b,c,p<0.05$ )

### 4.3. Asprosinin Serum FSH Seviyesi Üzerine Etkisi

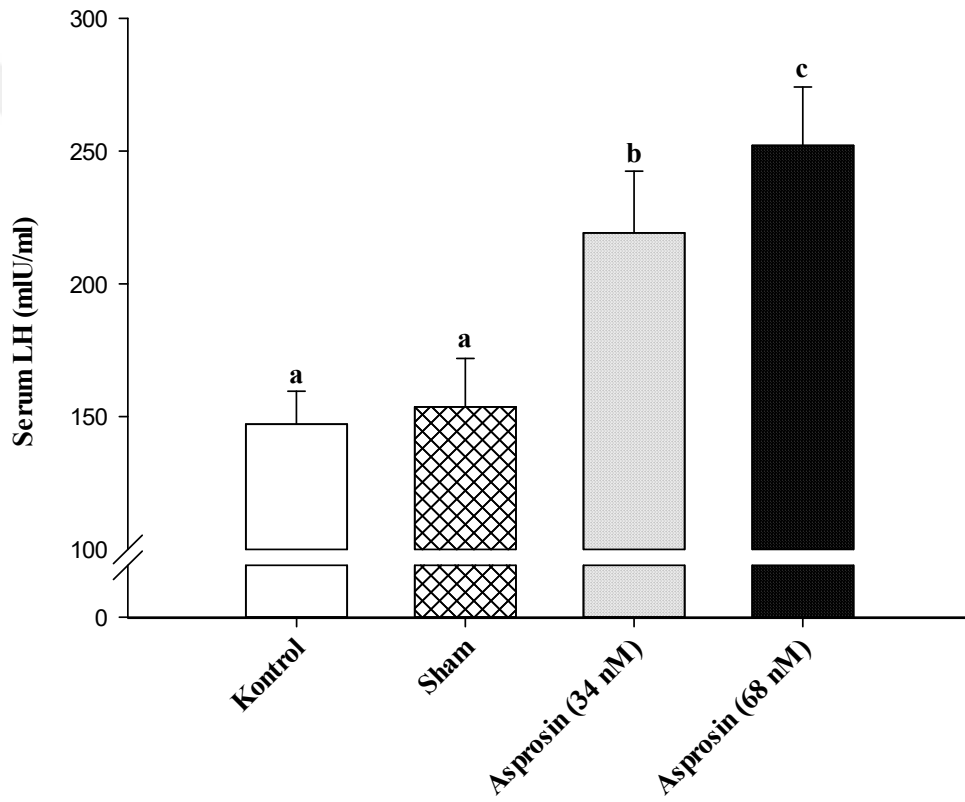
Asprosin uygulamasının serum FSH seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu kontrol ve sham grupları arasında serum FSH seviyeleri açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) öte yandan asprosin uygulama gruplarının kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum FSH seviyesinde artış tespit edildi ( $p<0.05$ ). 34 nM asprosin uygulanan grup 68 nM asprosin uygulanan grup ile kıyaslandığında ise 34nM asprosin grubunda serum FSH düzeyinin arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.3.** Asprosinin serum FSH seviyesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı;  $a,b p<0.05$ )

#### 4.4. Asprosinin Serum LH Seviyesi Üzerine Etkisi

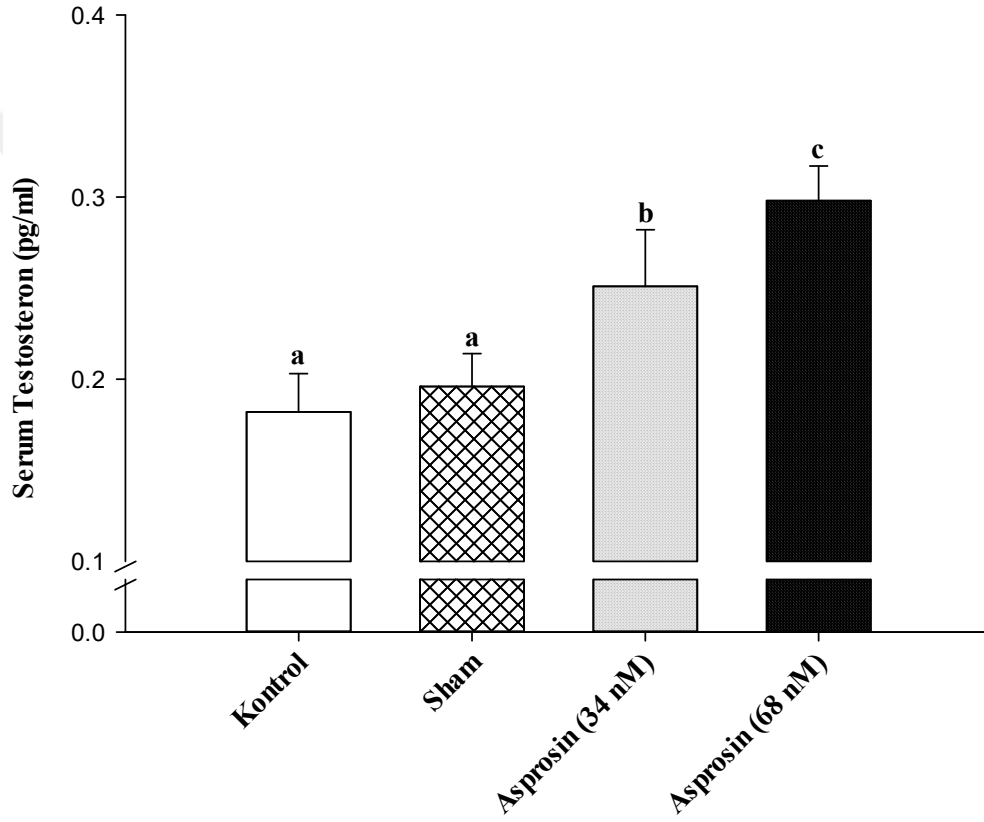
Asprosin uygulamasının serum LH seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol ve sham grupları arasında serum LH seviyeleri açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ), asprosin uygulanan gruplarda, kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum LH seviyesinin arttığı tespit edildi. Bunun yanı sıra 68 nM asprosin uygulanan grupta LH seviyesinin 34 nM asprosin uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu görüldü ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.4.** Asprosinin serum LH seviyesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort. ± SS olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı;  $a,b,c,p<0.05$ )

#### 4.5. Asprosinin Serum Testosteron Seviyesi Üzerine Etkisi

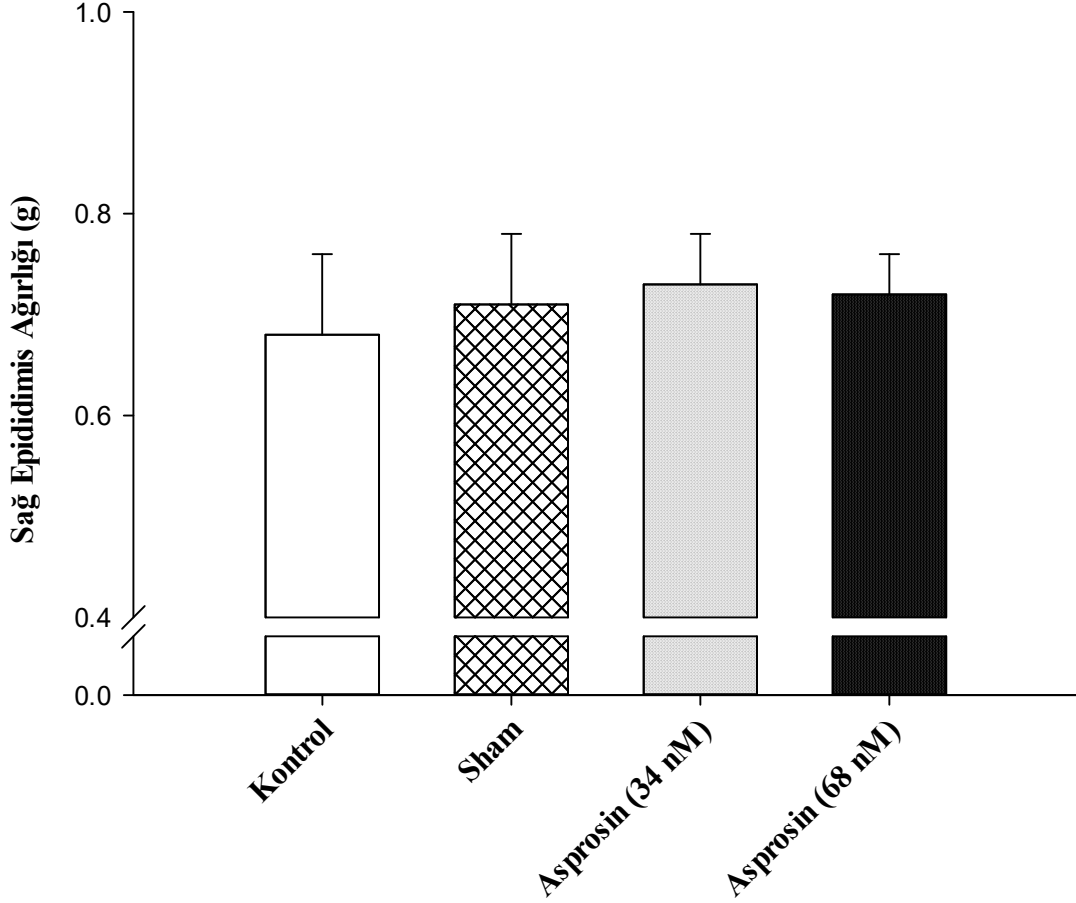
Asprosin uygulamasının serum testosteron seviyesinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.5.'te gösterilmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda kontrol ve sham gruplarının serum testosteron seviyelerinde herhangi bir farklılık olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ). Asprosin uygulama gruplarında ise kontrol ve sham gruplarına kıyasla serum testosteron seviyesini arttırdığı, ayrıca bu artışın doz bağımlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.5.** Asprosinin serum testosteron seviyesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a, b ve c birbirinden farklı;  $a,b,c,p<0.05$ )

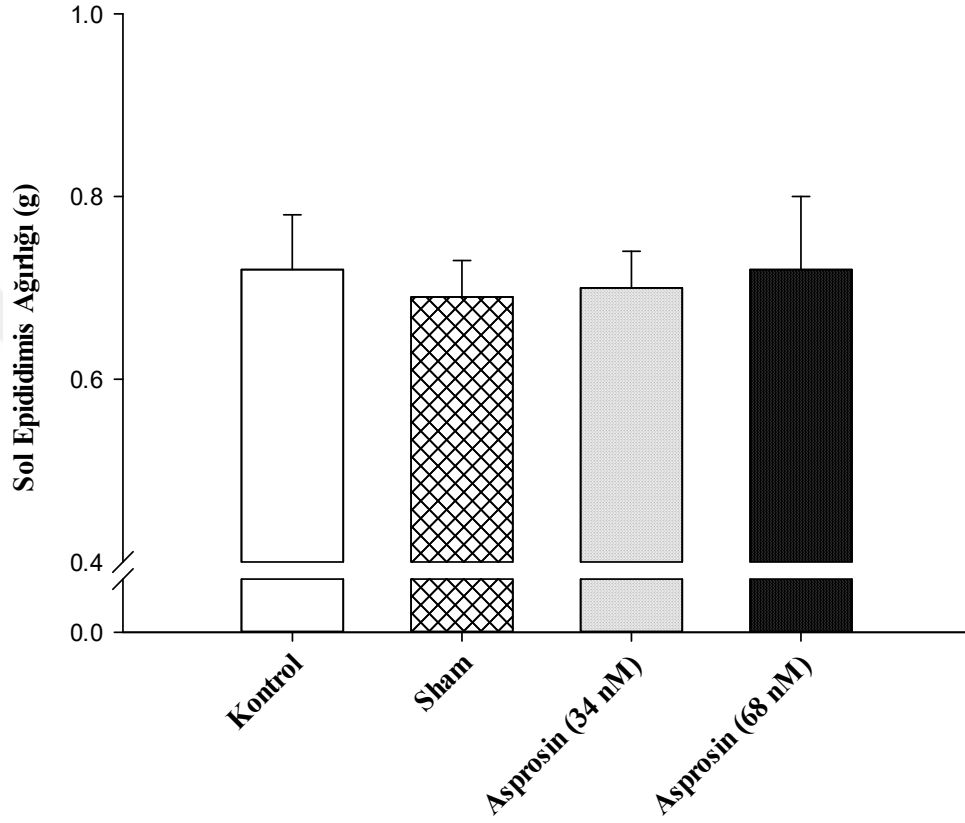
#### 4.6. Asprosinin Epididimis Ağırlıkları Üzerine Etkisi

Asprosin uygulamasının sağ epididimis ağırlığında meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında sağ epididimis ağırlıkları açısından bir farklılık olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.6.** Asprosin infüzyonunun sağ epididimis ağırlığı üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi.  $p>0.05$ )

Asprosin uygulamasının sol epididimis ağırlığında meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında sol epididimis ağırlıkları açısından bir farklılık olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ).

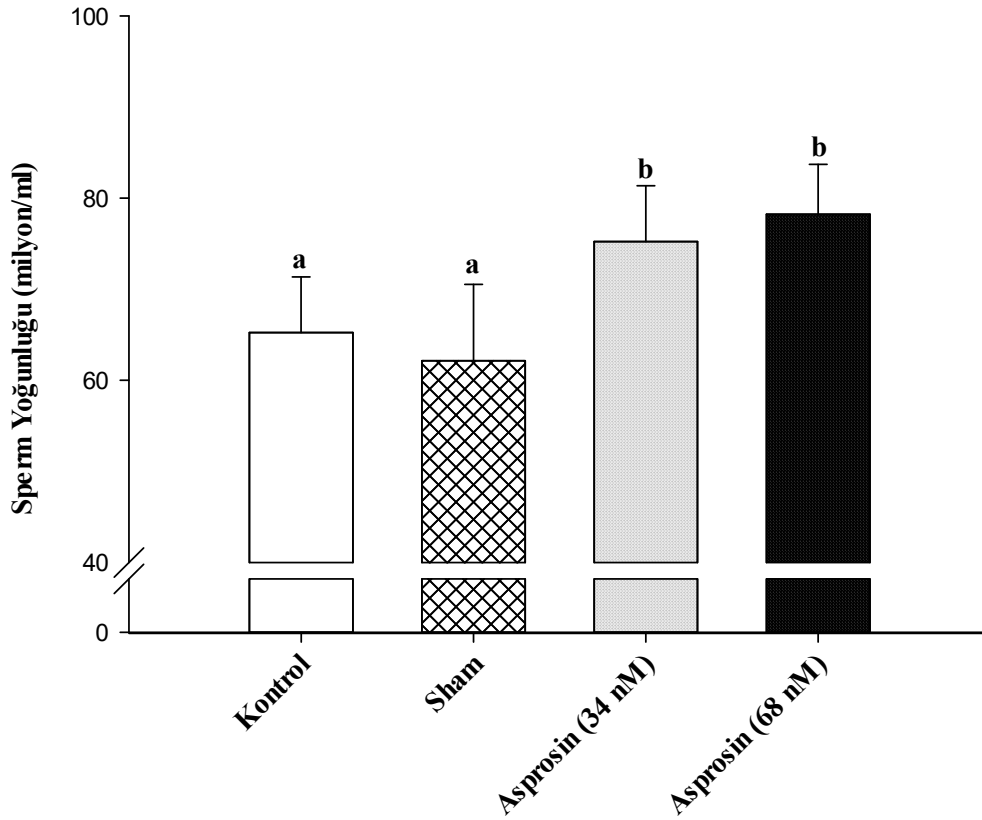


**Şekil 4.7.** Asprosin infüzyonunun sol epididimis ağırlığı üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi.  $p>0.05$ )

## 4.7. Asprosinin Sperm Parametrelerinin Değerlendirmesi

### 4.7.1. Asprosinin Sperm Yoğunluğu Üzerine Etkisi

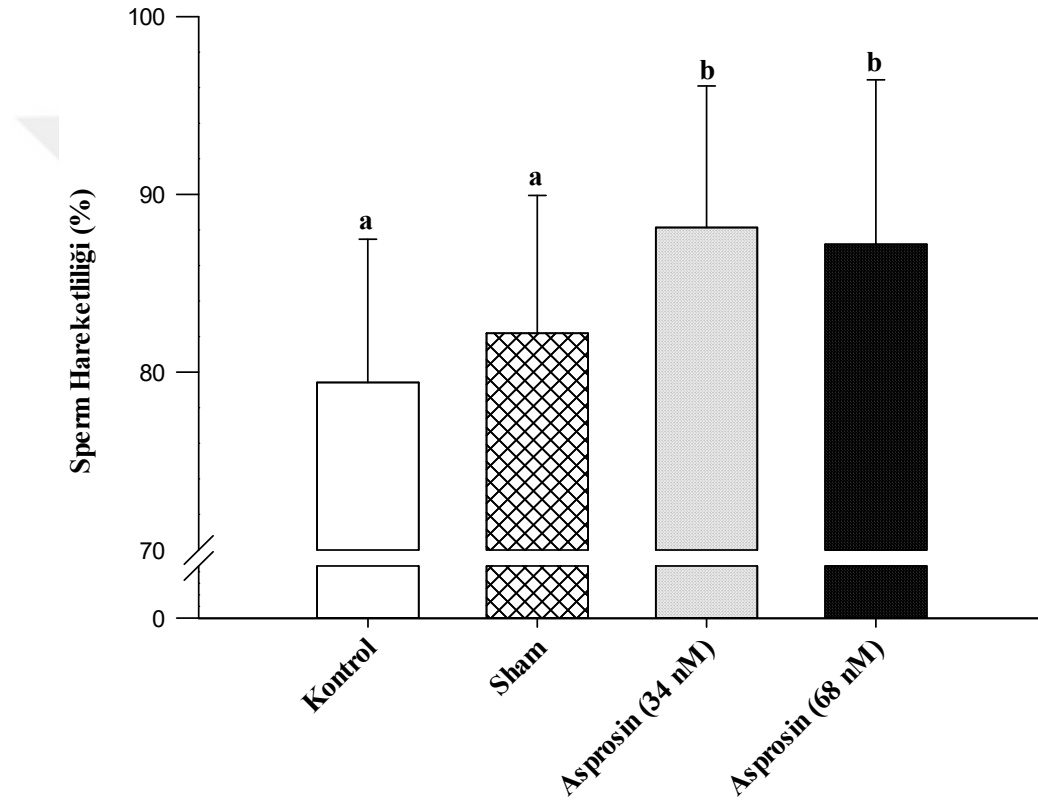
Asprosin uygulamasının sperm yoğunluğu düzeyinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu kontrol ve sham grupları arasında sperm yoğunluğu açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) öte yandan asprosin uygulama grupları da kontrol ve sham gruplarına kıyasla sperm yoğunluğunu arttırdığı tespit edildi ( $p<0.05$ ). 34 ve 68 nM asprosin uygulanan gruplar kıyaslandığında yüksek doz asprosin uygulanan grupta sperm yoğunluğunun arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.8.** Asprosinin sperm yoğunluğu üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı;  $a,bp<0.05$ )

#### 4.7.2. Asprosinin Sperm Hareketliliği Üzerine Etkisi

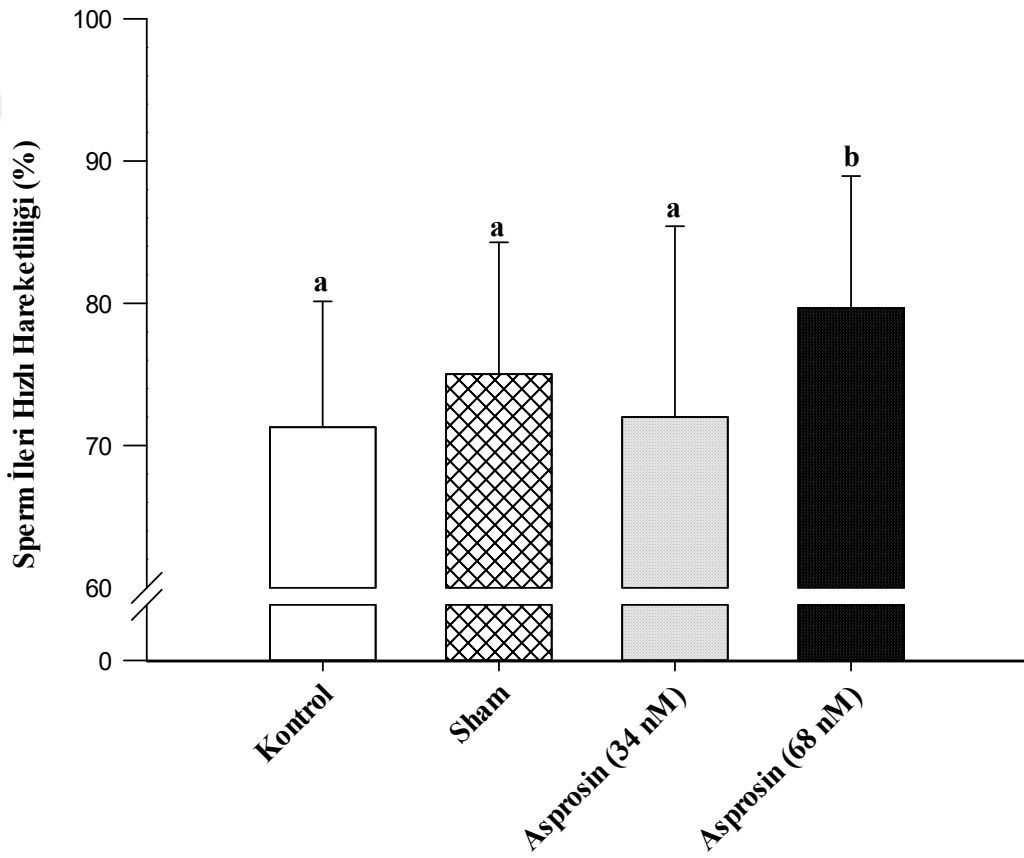
Asprosin uygulamasının sperm hareketlilik yüzdesinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu kontrol ve sham grupları arasında sperm hareketliliği açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) tespit edilirken asprosin uygulama gruplarında kontrol ve sham gruplarına kıyasla sperm hareketliliğini arttırdığı ( $p<0.05$ ), ancak bu artışın doz bağımlı olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.9.** Asprosinin sperm hareketliliği üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı;  $a,b p<0.05$ )

### 4.7.3. Asprosinin Sperm İleri Hareketliliği Üzerine Etkisi

Asprosin uygulamasının sperm ileri hareketliliğinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol, sham ve 34 nM asprosin grupları arasında sperm ileri hareketliliği açısından bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) tespit edilirken, 68 nM asprosin grubunda diğer gruplara kıyasla sperm ileri hareketliliğinde anlamlı bir artış gösterdiği sonucuna ulaşıldı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.10.** Asprosinin sperm ileri hızlı hareketliliği üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Değerler ort.  $\pm$  SS olarak ifade edildi. a ve b birbirinden farklı;  $a,bp<0.05$ )

## 5. TARTIŞMA

Üreme davranışı besin alımı ve susamada olduğu gibi merkezi sinir sistemi tarafından denetlenir (12). Bu denetim hem erkek hem de kadınlarda hipotalamus, hipofiz ve gonadlardan oluşan aks tarafından sağlanmaktadır (90). HHT aksı erkek üreme sistemi kontrolünde kilit rol oynar ve temel işlevi; üreme için gerekli hormonların salgısını kontrol etmek, sağlıklı sperm hücresi oluşumu ve olgunlaşmasını sağlamaktır (91). Bu aksta meydana gelebilecek hormonal bozukluklar büyük oranda erkek kaynaklı infertilite ile sonuçlanmaktadır (92). HHT aksı erkek üreme sistemi üzerindeki işlevini üç basamak üzerinden göstermektedir. İlk basamakta hipotalamustan ön hipofiz bezini uyaran GnRH salgısı gerçekleşir (93). Pulsatil salgılanan peptid yapılı GnRH, ergenlik dönemi başlangıcının temel belirleyicisidir (74). Yapılan çalışmalar HHT aksında meydana gelen bir hasar sonucu GnRH üretimindeki aksaklığın pubertal yetmezlik, cinsel gelişim bozukluğu ve kısırlığa yol açabildiğini göstermiştir (75). Adipoz doku, birçok merkezi ve çevresel uyarı tarafından düzenlenen HHT aksının çalışmasını ve düzenlenmesini etkileyen önemli bir dokudur (13). HHT aksını etkileyen yeni faktörlerin belirlenmesi üreme fizyolojisi/patofizyolojisini anlamamız açısından da önemini korumaktadır. Yapılan çalışmalar adipoz dokunun sadece enerji depo eden bir doku olmadığını, aynı zamanda adipokinler olarak adlandırılan çeşitli protein veya peptitleri üretebilen ve salgılayabilen aktif bir endokrin organ gibi çalıştığını ortaya koymaktadır. (13, 94). Birçok araştırma bu hormonların fertilité üzerinde olumlu veya olumsuz etkiler meydana getirdiğini göstermiştir (18, 95). Yakın zamanda yapılan çalışmalar adipokinlerin, HHT aksını uyardıklarını göstermiştir. Adipokinler HHT ekseninde erkek ve kadın üreme sistemini etkileyen pleiotropik etkilere sahiptir (96). Adipokin olarak tanımlanan leptinin HHT aksını aktive ederken (97, 98), bir başka yağ doku hormonu olan adiponektinin ise GnRH nöronlarını baskıladığı (99), FSH, LH ve testosteron hormon seviyelerini azalttığı (100) çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Yağ doku orjinli bir diğer peptid olan apelin-13'ün LH ve testosteron salgısını önemli düzeyde baskıladığı bildirilmiştir (14). Yine yapılan bir başka çalışmada Adipokin ailesinin bir başka üyesi olan resistinin, GnRH aktivitesini azaltarak LH hormon seviyesini azalttığı rapor edilmiştir (96). HHT aksını etkileyebileceği düşünülen yeni keşfedilmiş bir adipokin olan asprosin koku reseptörü olarak da görev alan OLF734 reseptörüne bağlanarak cAMP yolağını kullanır (23). Beyin ve testis dokusunda lokalize olan asprosinin kan beyin bariyerini geçtiği çeşitli

çalışmalarla ortaya konmuştur (21, 22, 25). Asprosin üzerinde yapılan bir araştırmada yarılanma ömrünün 145 dk olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada asprosin uygulamasının ArkN'de yer alan AgRP nöronlarını aktive ederken POMC nöronlarını inhibe ettiği belirlenmiştir (22). Çalışmamızda, 34 ve 68 nM konsantrasyonlarında merkezi olarak uygulanan asprosinin hipotalamus dokusunda GnRH protein seviyesinin arttığı ve bu artışın doz bağımlı olduğu belirlendi. HHT aksının ilk basamağında yer alan ve pulsatil salgılanan GnRH hormonunun, yarılanma ömrü kısa olan ve merkezi infüzyon şeklinde uygulanan asprosin etkisiyle artması asprosinin HHT aksı üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

HHT aksının ikinci basamağında GnRH tarafından uyarılan pitüiter bezden LH ve FSH hormon salgısı gerçekleşir. LH hormonu testislerdeki Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını indüklerken, FSH hormonu da testislerde lokalize olan sertoli hücrelerini uyararak spermatogenez destekler (101). Erkeklerde puberte dönemde üreme sisteminde oluşan hasar, testosteron seviyesinde azalma, konjenital anormallikler, cinsel işlev gelişiminde bozukluk ve infertiliteye neden olmaktadır (102). Yeni keşfedilen adipokin yapılı asprosinin cinsiyet hormonlarıyla arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda serum testosteron ve FSH'nin asprosin hormonuyla pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (43, 53, 78). Erkek fertilitesi üzerine yapılan bir başka çalışmada OLFR734'ün nakavt edildiği sıçanların plazma testosteron seviyesinde sağlıklı sıçanlara kıyasla anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (24). GnRH hormonu vücuttaki dalgalanmalara yanıt olarak hipofizden FSH ve LH hormonlarının salınımını gerçekleştirir. Çalışmamızda asprosin uygulanan gruplarda FSH ve LH hormon seviyelerinin arttığı belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre LH hormonundaki artışın doz bağımlı olduğu bulundu. Ön hipofizden salgılanan LH testis hücresi olan Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgısını artırır (4). Çalışmamızın sonuçları literatür ile uyum göstererek asprosin uygulanan gruplarda serum testosteron seviyesini doz bağımlı olarak arttırdı. Çalışmamızda artan serum FSH ve LH hormonlarının testis dokusunu etkileyerek serum testosteron seviyesini arttırdığı düşünülmektedir. Ayrıca HHT aksında yer alan bu hormonların artışı, asprosinin fertilitate üzerine olumlu etki gösterebileceğini akla getirmektedir.

İnfertilite son zamanlarda göze çarpan ancak ihmal edilen küresel bir sorun haline gelmiştir (92). Hastalıklarla ilişkili infertilite her iki cinsiyeti de etkileyebildiği gibi tek cinsiyete özgü de olmaktadır (103). Her iki cinsiyette infertiliteyi etkileyen faktörler arasında hipogonadotrofik hipogonadizm, hiperprolaktinemi, kistik fibrozis,

enfeksiyonlar, sistemik hastalıklar, yaşam tarzıyla ilgili faktörler veya hastalıklar yer almıştır. Erkek kısırlığı ise yıllar içinde gözlenen yaşa bağlı semen azalması, endokrin bozukluklar, alkol, sigara vb. olarak yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (103, 104). İnfertiliteyi etkileyen bu sebepler üreme fizyolojisinde önemli bir role sahip olan HHT aksının yapısını da bozmaktadır (8). HHT aksını etkileyeceği düşünülen asprosinin üreme sistemi üzerindeki etkisini ortaya koyabilecek çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. OLF734 knockout farelerin testis ağırlığı, sperm sayısı, morfolojisi, kalitesi ve canlılığı bakımından knockout olmayan fareler ile benzer olduğu gösterilmiştir. Ancak OLF734 knockout farelerde sperm ileri hareketliliğinde anlamlı bir azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (24). Erkeklerde toplam sperm sayısı, sperm yoğunluğu ve sperm ileri hareketliliği fertilitiyi etkileyen en önemli parametreler arasındadır. Erkeklerde yaşın ilerlemesiyle birlikte üretilen spermin kalitesi ve miktarındaki azalmalar infertiliteye sebep olmuştur (105). Spermin ileri hareketliliği aktif olarak hareket edebilen spermatozoanın göstergesidir ve üreme yolunda spermatozoon hareketi için anahtar rol oynamaktadır (24, 106). Wei ve ark. yaptıkları bir çalışmada hem OLF734 knockout hem de knockout olmayan farelere eksojen asprosin uygulamasının sperm ilerleyici hareketliliği ve fertilitelerini önemli düzeyde arttırdığını bildirmiştir (24). Çalışmamızda 34 ve 68 nM dozlarında merkezi infüzyon şeklinde 14 gün asprosin uygulaması sonrası epididimis ağırlıklarında gruplar arası anlamlılık bulunamadı, ancak sperm hareketliliği ve yoğunluğunun anlamlı olarak arttığı belirlendi. Ayrıca sperm ileri hızlı hareketliliğinde yüksek doz asprosin uygulanan grupta diğer gruplara göre anlamlı bir yükselme olduğu bulundu. Bu sonuçların literatür ile uyumlu olduğu görüldü. Elde edilen bu veriler değerlendirildiğinde artan serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin spermatogenezini arttırdığı ve bu artışın sperm yoğunluğu, hareketliliği ve ileri hızlı hareketini arttırdığını düşünmekteyiz.

Çalışmamız sıçanlara merkezi olarak uygulanan asprosinin hipotalamus dokusunda GnRH mRNA ve doku protein düzeyini arttırdığı görüldü. Bu kapsamda asprosin-GnRH ilişkisi kısmen de olsa belirlenmiştir. Özellikle pulsatil salgıya bağlı olarak GnRH analizlerinde dalgalanmaların ortaya çıkmamasının en önemli nedenlerinden birinin asprosinin infüzyon şeklinde uygulanmasına bağlı olarak korunduğunu düşünmekteyiz. Şöyle ki; bu çalışmada kullanılan ozmotik mini pompalar her saat tekrarlanabilir bir şekilde 14 gün süresince uygulamaya imkan verecek şekilde geliştirildiğinden, 145 dakika yarılanma ömrüne sahip asprosinin, plazma ve dokularda yıkımlanması önemli düzeyde engellenerek uzun süreli olarak aktif kalmasına olanak

sağlamaktadır. Bu şekilde asprosinin, GnRH üzerindeki bu aktive edici tarzdaki etkinin devamlılığının sağlandığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda ayrıca asprosin uygulamasının sıçanların serum LH, FSH ve testosteron düzeylerini önemli düzeyde arttırdığı görüldü. Asprosin uygulamasına bağlı olarak, HHT aksının diğer bileşenleri olan hipofiz (LH ve FSH) ve testis (testosteron) dokularından salgılanan hormonlardaki meydana gelen bu artış, özellikle asprosinin GnRH üzerindeki uzun süreli aktive edici etkisinden kaynaklandığını bizlere düşündürmektedir. Çünkü hipotalamustan salgılanan GnRH ön hipofizi uyararak FSH ve LH hormon salgısını gerçekleştirir (107). LH hormonu testislerdeki Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını indüklerken (108), FSH hormonu da testislerde lokalize olan sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezi sağlar (101). Çalışmamız bulgularına bakıldığında asprosin uygulamasına bağlı olarak; GnRH, LH ve testosteron düzeylerinin doz bağımlı tarzda arttığı ancak FSH hormon düzeyinin asprosin uygulanan (34 ve 68 nM) gruplarda benzer olduğu görülmektedir. GnRH pulse jenaretöründeki değişikliklere LH kısa süre içerisinde hızlı bir şekilde uyum sağlarken, FSH'nın daha uzun sürede gecikmiş yanıt ortaya koymasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. HHT aksının aktivasyonu ile son ürün olarak elde edilen sperm hücreleri çalışmamız kapsamında incelenerek sperm sayısında, kalitesinde ve hareketliliğinde, asprosin uygulamasına bağlı olarak artış meydana geldiği belirlendi. Sperm sayı ve hareketliliğinde meydana gelen artışın özellikle asprosin uygulamasına bağlı olarak serum FSH seviyesindeki artışa bağlı olarak oluştuğunu söyleyebiliriz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonuçlarımız bir bütün olarak değerlendirildiğinde fizyolojik mekanizma her ne kadar şimdilik açık olmasa da; asprosin HHT aksını uyarabilmekte ve erkek üreme hormon salgısında artışa neden olmaktadır. Özellikle elde edilen bu ilk bulgular HHT aksındaki hormonal bozukluklara bağlı olarak meydana gelen infertilite patofizyolojisi için umut verici görülmektedir. Ancak yapılacak ileri düzey araştırmalar ile testis dokusundaki OLFR734 reseptörleri ile spermatogenez ve testiküler hormon salgıları arasında etkileşim olup olmadığının belirlenebilmesi durumunda, asprosinin erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri daha anlaşılır olacaktır. Ayrıca asprosinin libido ve dişi üreme sistemi üzerindeki muhtemel etkileri halen gizemini korumaktadır. Bu alanda yeni araştırmaların tasarlanmasına ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. İnfertilite (Kısırlık) Nedir? 2020.  
<https://ezheah.saglik.gov.tr/TR,396649/infertilite-kisirlilik-nedir.html> Son Erişim Tarihi 06.08.2020.
2. Yılmaz F. Sperm değerlendirme testleri: dünden bugüne. *J Health Sci Med.* 2019,3(1):71-6.
3. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.  
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42576/9241590300.pdf#page=3> Son Erişim Tarihi 07.12.2020.
4. National Center for Health Statistics, Division of Vital Statistics.  
[https://www.cdc.gov/nchs/nsfg/key\\_statistics/i.htm#infertilityservices](https://www.cdc.gov/nchs/nsfg/key_statistics/i.htm#infertilityservices). 2017, Son Erişim Tarihi 24.08.2020.
5. National Collaborating Centre for WsCs, Health. *National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance.* Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. London, Royal College of Obstetricians & Gynaecologists Copyright © 2013, National Collaborating Centre for Women's and Children's Health., 2013.
6. Aile Planlaması  
[http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2013/rapor/TNSA\\_2013\\_ana\\_rapor.pdf](http://www.hips.hacettepe.edu.tr/tnsa2013/rapor/TNSA_2013_ana_rapor.pdf)  
Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması 2013, Son Erişim Tarihi 07.12.2020.
7. Çayan S. *Erkek infertilitesi değerlendirme, medikal ve cerrahi tedaviler* 2015.
8. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reprod Biomed Online.* 2001,2(1):173-85.
9. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury.* Bethesda (MD), National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012.
10. Özbey İ. Erkek hipotalamo – hipofizer – gonadal aksın yapısı. *Androloji Bülteni.* 2006,25:132-7.
11. Yardımcı A, Keleştimur H. Puberte nöroendokrinolojisi ve gonadotropin salgılatıcı hormon nöronları. *Nobel Medicus Journal.* 2019,15(2):17-24.

12. Hall JE, Guyton AC. *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji*. 12.Baskı. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri, 2013.
13. Reverchon M, Maillard V, Froment P, Ramé C, Dupont J. Adiponectine et résistine-Un rôle dans les fonctions de reproduction? *Médecine/Sciences*. 2013,29(4):417-24.
14. Sandal S, Tekin S, Seker FB, Beytur A, Vardi N, Colak C, Tapan T, Yildiz S, Yilmaz B. The effects of intracerebroventricular infusion of apelin-13 on reproductive function in male rats. *Neurosci Lett*. 2015,602:133-8.
15. Carobbio S, Pellegrinelli V, Vidal-Puig A. Adipose tissue function and expandability as determinants of lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Adv in Exp Med Biol*. 2017,960:161-96.
16. Stephens JM. The fat controller: adipocyte development. *PLoS biology*. 2012,10(11):e1001436.
17. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *TEM*. 2000,11(8):327-32.
18. Dag Z, Dilbaz B. Impact of obesity on infertility in women. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2015,16(2):111.
19. Tekin S, Beytur A, Erden Y, Beytur A, Cigremis Y, Vardi N, Turkoz Y, Tekedereli I, Sandal S. Effects of intracerebroventricular administration of irisin on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis in male rats. *Journal of cellular physiology*. 2019,234(6):8815-24.
20. Li Z, Zheng S, Xu T, Guan Y, Zhang Y, Miao C. Subfatin is a novel adipokine and unlike Meteorin in adipose and brain expression. *CNS Neurosci Ther*. 2014,20(4):344-54.
21. Romere C, Duerrschmid C, Bournat J, Constable P, Jain M, Xia F, Saha PK, Del Solar M, Zhu B, York B, Sarkar P, Rendon DA, Gaber MW, LeMaire SA, Coselli JS, Milewicz DM, Sutton VR, Butte NF, Moore DD, Chopra AR. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell*. 2016,165(3):566-79.
22. Duerrschmid C, He Y, Wang C, Li C, Bournat JC, Romere C, Saha PK, Lee ME, Phillips KJ, Jain M, Jia P, Zhao Z, Farias M, Wu Q, Milewicz DM, Sutton VR, Moore DD, Butte NF, Krashes MJ, Xu Y, Chopra AR. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nature Medicine*. 2017,23(12):1444-53.

23. Li E, Shan H, Chen L, Long A, Zhang Y, Liu Y, Jia L, Wei F, Han J, Li T, Liu X, Deng H, Wang Y. OLF734 mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin. *Cell metabolism*. 2019,30(2):319-28.
24. Wei F, Long A, Wang Y. The Asprosin-OLF734 hormonal signaling axis modulates male fertility. *Cell Discov*. 2019,5:55.
25. Kocaman N, Kuloglu T. Expression of asprosin in rat hepatic, renal, heart, gastric, testicular and brain tissues and its changes in a streptozotocin-induced diabetes mellitus model. *Tissue Cell*. 2020,66:101397.
26. Riera CE, Tsaousidou E, Halloran J, Follett P, Hahn O, Pereira MMA, Ruud LE, Alber J, Tharp K, Anderson CM. The sense of smell impacts metabolic health and obesity. *Cell Metabolism*. 2017,26(1):198-211.
27. Griffin CA, Kafadar KA, Pavlath GK. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Developmental Cell*. 2009,17(5):649-61.
28. Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science*. 2003,299(5615):2054-8.
29. Neuhaus EM, Zhang W, Gelis L, Deng Y, Noldus J, Hatt H. Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2009,284(24):16218-25.
30. Shepard BD, Cheval L, Peterlin Z, Firestein S, Koepsell H, Doucet A, Pluznick JL. A renal olfactory receptor aids in kidney glucose handling. *Sci Rep*. 2016,6:35215.
31. Kang N, Koo J. Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. *BMB reports*. 2012,45(11):612.
32. Bjarnadóttir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schiöth HB. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*. 2006,88(3):263-73.
33. Chen S, Wang X, Qiu CM, Hou JN, Wei XY, Xiang CX, Tang MY, Zhang R, Pei HF. Study of the role and mechanism of asprosin/spartin pathway in cardiac microvascular endothelial injury induced by diabetes mellitus. *Sichuan Da Xue*. 2019,50(6):827-34.
34. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *J Toxicol Pathol*. 2007,35(4):495-516.

35. Zhang Z, Tan Y, Zhu L, Zhang B, Feng P, Gao E, Xu C, Wang X, Yi W, Sun Y. Asprosin improves the survival of mesenchymal stromal cells in myocardial infarction by inhibiting apoptosis via the activated ERK1/2-SOD2 pathway. *Life Sci.* 2019,231:116554.
36. Hoffmann JG, Xie W, Chopra AR. Energy regulation mechanism and therapeutic potential of asprosin. *Diabetes.* 2020,69(4):559-66.
37. Jung TW, Kim HC, Kim HU, Park T, Park J, Kim U, Kim MK, Jeong JH. Asprosin attenuates insulin signaling pathway through PKCdelta-activated ER stress and inflammation in skeletal muscle. *J Cell Physiol.* 2019,234(11):20888-99.
38. DeFronzo RA. The triumvirate:  $\beta$ -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 1988,37(6):667-87.
39. Cerf ME. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol.* 2013,4:37.
40. Lee T, Yun S, Jeong JH, Jung TW. Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Mol Cell Endocrinol.* 2019,486:96-104.
41. Del Prato S, Tiengo A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001,17(3):164-74.
42. Wang Y, Qu H, Xiong X, Qiu Y, Liao Y, Chen Y, Zheng Y, Zheng H. Plasma Asprosin Concentrations Are Increased in Individuals with Glucose Dysregulation and Correlated with Insulin Resistance and First-Phase Insulin Secretion. *Mediators Inflamm.* 2018,2018:9471583.
43. Li X, Liao M, Shen R, Zhang L, Hu H, Wu J, Wang X, Qu H, Guo S, Long M, Zheng H. Plasma asprosin levels are associated with glucose metabolism, lipid, and sex hormone profiles in females with metabolic-related diseases. *Mediators Inflamm.* 2018,2018:7375294.
44. Acara AC, Güler A. Investigation of the relationship between asprosin levels and metabolic parameters observed in clinical follow-up in patients with type 2 diabetes. *J Basic Clin Health Sci.* 2019,3(3):128-34.
45. Hekim MG, Kelestemur MM, Bulmus FG, Bilgin B, Bulut F, Gokdere E, Ozdede MR, Kelestimur H, Canpolat S, Ozcan M. Asprosin, a novel glucogenic adipokine: a potential therapeutic implication in diabetes mellitus. *Arch Physiol Biochem.* 2021:1-7.

46. Wang M, Yin C, Wang L, Liu Y, Li H, Li M, Yi X, Xiao Y. Serum Asprosin Concentrations Are Increased and Associated with Insulin Resistance in Children with Obesity. *Ann Nutr Metab.* 2019,75(4):205-12.
47. Wang CY, Lin TA, Liu KH, Liao CH, Liu YY, Wu VC, Wen MS, Yeh TS. Serum asprosin levels and bariatric surgery outcomes in obese adults. *Int J Obes (Lond).* 2019,43(5):1019-25.
48. Ugur K, Aydin S. Saliva and Blood Asprosin Hormone Concentration Associated with Obesity. *Int J Endocrinol.* 2019:2521096.
49. Templeton A. Infertility-epidemiology, aetiology and effective management. *Health Bull.* 1995,53(5):294-8.
50. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update.* 2010,16(3):231-45.
51. Kukuvtis A, Georgiou I, Ioannidis S, Tarlatzis B, Bontis J, Papadimas J. Congenital obstructive azoospermia in a man with Marfan syndrome. *Fertil Steril.* 2001,76(6):1256-7.
52. Stepto NK, Cassar S, Joham AE, Hutchison SK, Harrison CL, Goldstein RF, Teede HJ. Women with polycystic ovary syndrome have intrinsic insulin resistance on euglycaemic-hyperinsulaemic clamp. *Hum Reprod.* 2013,28(3):777-84.
53. Alan M, Gürlek B, Yılmaz A, Aksit M, Aslanıpour B, Gülhan I, Mehmet C, Taner CE. Asprosin: A novel peptide hormone related to insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2019,35(3):220-3.
54. Jiang Y, Liu Y, Yu Z, Yang P, Xie L, Shang X, Zhao S, Zhao S. *Serum asprosin level in different subtypes of polycystic ovary syndrome: A cross-sectional study* <https://www.researchsquare.com/article/rs-41704/v12020>, Son Erişim Tarihi 15.11.2020.
55. Tarricone R, Ricca G, Nyanzi-Wakholi B, Medina-Lara A. Impact of cancer anorexia-cachexia syndrome on health-related quality of life and resource utilisation: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016,99:49-62.
56. Kato Y, Tsuta K, Seki K, Maeshima AM, Watanabe S, Suzuki K, Asamura H, Tsuchiya R, Matsuno Y. Immunohistochemical detection of GLUT-1 can

- discriminate between reactive mesothelium and malignant mesothelioma. *Modern Pathology*. 2007,20(2):215-20.
57. Zhang L, Chen C, Zhou N, Fu Y, Cheng X. Circulating asprosin concentrations are increased in type 2 diabetes mellitus and independently associated with fasting glucose and triglyceride. *Clinical Chimica Acta*. 2017,489:183-8.
58. Du C, Wang C, Guan X, Li J, Du X, Xu Z, Li B, Liu Y, Fu F, Huo H, Zheng Z. Asprosin is associated with anorexia and body fat mass in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2020,29:1369-75.
59. Kocaman N, Artas G. Can novel adipokines, asprosin and meteorin-like, be biomarkers for malignant mesothelioma? *Biotech Histochem*. 2020,95(3):171-5.
60. Acara AC, Bolatkale M, Kızıloğlu I, İbişoğlu E, Can C. A novel biochemical marker for predicting the severity of ACS with unstable angina pectoris: Asprosin. *Am Journal Emergency Medical*. 2018,36(8):1504-5.
61. Feng J, Yang Y, Yang Y, Pei H. The protective role of Asprosin against diabetes in cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol*. 2018,72:2.
62. Boeree G. *The emotional nervous system* <http://webspaceship.edu/cgboer/limbicsystem.html>, 2009 Son Erişim Tarihi 17.11.2020.
63. Lechan RM, Toni R. *Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary*. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland HJ, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP. South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc., 2000.
64. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks H. *Ganong's Review of Medical Physiology*. McGraw-Hill Education New York, NY, USA, 2009.
65. Ağar E. *İnsan Fizyolojisi Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, İstanbul Tıp Kitabevi*, 2020.
66. Barbosa DA, de Oliveira-Souza R, Santo FM, de Oliveira Faria AC, Gorgulho AA, De Salles AA. The hypothalamus at the crossroads of psychopathology and neurosurgery. *Neurosurgical focus*. 2017,43(3):E15.
67. Molina PE. *Endocrine Physiology*. Fifth Edition, McGraw-Hill Education, 2018.
68. White B, Harrison JR, Mehlmann L. *Endocrine and Reproductive Physiology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 2018.

69. Marques P, Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. *Physiology of GnRH and Gonadotropin Secretion*. South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc. Copyright, 2000.
70. Barrett KE, Barman SM, Brooks HL, Yuan JXJ. *Ganong's Review of Medical Physiology*. McGraw-Hill Education, 2019.
71. Lipshultz LI, Howards SS, Niederberger CS. *Infertility in the Male*. Cambridge University Press, 2009.
72. Clarke IJ, Cummins JT. Pulsatility of reproductive hormones: physiological basis and clinical implications. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1987,1(1):1-21.
73. Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR, Nunemaker CS. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*. 2003,24(2):79-93.
74. Nabi G, Amin M, Gul N, Ali S, Khan AA. Mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) pulse generation: A review. *IJSER*. 2014,5:354-58.
75. Learn about GnRH deficiency: Kallmann syndrome <https://www.chuv.ch/en/hhn/hhn-home/patients/learn-about-gnrh-deficiency-kallmann-syndrome> COST European Cooperation in Science and Technology, GnRH Network, 2018 Son Erişim Tarihi 15.01.2021.
76. Bhasin S, Gagliano-Jucá T, Huang G, Basaria S. *Age-related changes in the male reproductive system*. Endocrinology of Male Reproduction, MDText. com, Inc., 2018.
77. Plante G, Prud'homme B, Fan J, Lafleur M, Manjunath P. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell Tissue Res*. 2016,363(1):105-27.
78. Deniz R, Yavuzkir S, Ugur K, Ustebay DU, Baykus Y, Ustebay S, Aydin S. Subfatin and asprosin, two new metabolic players of polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol*. 2020:1-6.
79. Kretser DM, Meinhardt A, Meehan T, Phillips DJ, O'Bryan MK, Loveland KA. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Mol Cell Endocrinol*. 2000,161(1-2):43-6.
80. Chemes HE, Alvarez Sedo C. Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl*. 2012,14(1):14-23.

81. Guo J, Zhao Y, Huang W, Hu W, Gu J, Chen C, Zhou J, Peng Y, Gong M, Wang Z. Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. *Int J Clin Exp Med*. 2014,7(10):3550-5.
82. Krsmanovic LZ, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metabolism*. 2009,20(8):402-8.
83. Demir M, Yılmaz B. Endokrin hastalıklar ve İnfertilite. *Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite El Kitabı*. 2019:445-60.
84. Erkek Hipogonadizmi Tanı ve Tedavisi. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2019.
85. Press HW. Artificial cerebrospinal fluid (ACSF) <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/9/pdb.rec065730.full#cited-by>, 2011 Son Erişim Tarihi 21.03.2021.
86. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. 6th, Elsevier, 2006.
87. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 2001,25(4):402-8.
88. Tekedereli I, Alpay SN, Tavares CD, Cobanoglu ZE, Kaoud TS, Sahin I, Sood AK, Lopez-Berestein G, Dalby KN, Ozpolat B. Targeted silencing of elongation factor 2 kinase suppresses growth and sensitizes tumors to doxorubicin in an orthotopic model of breast cancer. *PloS one*. 2012,7(7):e41171.
89. Tekedereli I, Alpay SN, Akar U, Yuca E, Ayugo-Rodriguez C, Han HD, Sood AK, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013,2(9):e121.
90. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism*. 2018,86:3-17.
91. Zamboni M, Rossi AP, Fantin F, Zamboni G, Chirumbolo S, Zoico E, Mazzali G. Adipose tissue, diet and aging. *Mech Ageing Dev*. 2014,136-137:129-37.

92. Morshed-Behbahani B, Lamyian M, Joulaei H, Rashidi BH, Montazeri A. Infertility policy analysis: a comparative study of selected lower middle- middle- and high-income countries. *Globalization and health*. 2020,16(1):104.
93. Hasdemir PS, Terzi H, Koltan SO. Hipogonadotropik hipogonadizm olgularına yaklaşım: infertilite tedavisi ve uzun dönem yönetim. *Kocaeli Tıp Dergisi*. 2015,4(1):13-8.
94. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2008,14(11-12):741-51.
95. Estienne A, Reverchon M, Partyka A, Bourdon G, Grandhaye J, Barbe A, Caldas-Silveira E, Rame C, Nizański W, Froment P, Dupont J. Chemerin impairs in vitro testosterone production, sperm motility, and fertility in chicken: Possible involvement of its receptor CMKLR1. *Cells*. 2020,9(7):1-25.
96. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Avgoustinaki P, Malliaraki N, Mytaras V, Margioris AN. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Hormones (Athens)*. 2015,14(4):549-62.
97. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology*. 2009,150(6):2805-12.
98. El-Eshmawy MM, Abdel Aal IA, El Hawary AK. Association of ghrelin and leptin with reproductive hormones in constitutional delay of growth and puberty. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010,8:153.
99. Wen JP, Lv WS, Yang J, Nie AF, Cheng XB, Yang Y, Ge Y, Li XY, Ning G. Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008,371(4):756-61.
100. Cheng L, Shi H, Jin Y, Li X, Pan J, Lai Y, Lin Y, Jin Y, Roy G, Zhao A, Li F. Adiponectin deficiency leads to female subfertility and ovarian dysfunctions in mice. *Endocrinology*. 2016,157(12):4875-87.
101. Serge AJ, Francisco T, Romesh K, George TG. Follicle stimulating hormone abnormalities. *Medscape*. 2020:1-16.
102. Kalkanlı A, Kadioğlu A. *Hipogonadizm Tanı, Tedavi ve Takip Kılavuzu*. Türk Üroloji Derneği2020.
103. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018,62:2-10.

104. Ben Messaoud K, Bouyer J, de La Rochebrochard E. Infertility treatment in France, 2008-2017: A challenge of growing treatment needs at older ages. *Am J Public Health*. 2020,110(9):1418-20.
105. National public health action plan for the detection, prevention, and management of infertility. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention, 2014.
106. Freitas MJ, Vijayaraghavan S, Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod*. 2017,96(1):2-12.
107. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1978,202(4368):631-3.
108. Zhou R, Wu J, Liu B, Jiang Y, Chen W, Li J, He Q, He Z. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2019,76(14):2681-95.

## **EKLER**

### **EK 1. ETİK KURUL KARARI**



## EK 2. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Tuba KESKİN

Adres

### Eğitim Durumu

|                  |   |                      |
|------------------|---|----------------------|
| Lisans           | Kastamonu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi<br>Beslenme ve Diyetetik Bölümü | 2012-2017            |
| Yüksek<br>Lisans | İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü<br>Fizyoloji Anabilim Dalı          | 2019–Devam<br>Ediyor |

### İlgi Alanları

Nöroendokrinoloji, Beslenme Fizyolojisi, Üreme Fizyolojisi, Sinirbilim, Hücre Kültürü, Kanser Araştırmaları

### TÜBİTAK Destekli Araştırma Projeleri

1. “Mitokondriyal-Türevli Peptid (Mots-c)’in İnsan Kolon ve Meme Kanseri Hücre Serilerinde Antikanserojenik Etkilerinin Belirlenmesi: *in vitro* Bir Çalışma”, TÜBİTAK 3501-Kariyer Geliştirme Programı, TÜBİTAK- 318S235, **Bursiyer**, (2019- Devam ediyor).

### BAP Destekli Araştırma Projeleri

1. “Erkek Sıçanlara İntraserebroventriküler Asprosin Uygulamasının Üreme Hormonları Üzerine Etkileri”, İÜBAP Yüksek Lisans Projesi, TYL-2020-2185, **Araştırmacı**, (2020- Devam ediyor).

## **TÜBİTAK Destekli Etkinlik Projeleri**

1. “Sağlık Bilimleri Alanında TÜBİTAK için Ulusal ve Uluslararası Proje Hazırlama Süreci” 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı, TÜBİTAK 1129B371900871, **Yardımcı Personel** (10-13 Ekim 2019).
2. “Sağlık Bilimleri Alanında Lisansüstü Öğrencilerine Yönelik Laboratuvar Hayvanlarında İleri Düzey Deneysel Araştırmalar Kursu” 2237-A Bilimsel Eğitim Etkinliklerini Destekleme Programı, **Katılımcı** (24-27 Ekim 2019).
3. “Lisans Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş ve TÜBİTAK 2209 Üniversite Öğrencileri Projeleri Hazırlama Süreci” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK 1129B371901170, **Yardımcı Personel** (20-23 Şubat 2020).
4. “Ulusal ve Uluslararası TÜBİTAK Projesi Hazırlama Süreci 2020” 2237-B Proje Eğitimi Etkinliklerini Destekleme Programı, TÜBİTAK 1129B372000108, **Yardımcı Personel** (25-27 Eylül 2020).
5. “Lisans Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş ve TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Hazırlama Süreci 2020” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK 1129B372000492, **Yardımcı Personel** (10-13 Aralık 2020).
6. “Sağlık Bilimleri Alanında Lisans Eğitimi Gören Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş Ve Proje Eğitimi: TÜBİTAK Bilim Okulu” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, **Yardımcı Personel** (4-7 Mart 2021).
7. “Sağlık Ve Doğa Bilimleri Lisans Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş: Bilim Okulu” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, **Yardımcı Personel** (11-14 Mart 2021).
8. “Sağlık, Doğa Ve Fen Bilimleri Alanı Lisans Öğrencilerine Yönelik Uygulamalı Proje Önerisi Hazırlama, Yürütme Ve Akademik Kazanımlar Eğitimi/2” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, **Yardımcı Personel** (18-21 Mart 2021).
9. “Lisans Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş ve TÜBİTAK 2209 Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Hazırlama Süreci” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, **Yardımcı Personel** (25-28 Mart 2021).

10. “Tıp Fakültesi Lisansüstü Öğrencilerine Yönelik Laboratuvar Hayvanlarında İleri Düzey Deneysel Araştırmalar Kursu” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, *Yardımcı Personel* (1-4 Nisan 2021).
11. “Sağlık Bilimleri Alanında Ulusal ve Uluslararası TÜBİTAK Projesi Hazırlama ve Yürütme Uygulamalı Eğitimi” 2237-B Proje Eğitimi Etkinliklerini Destekleme Programı, TÜBİTAK 1129B372000540, *Yardımcı Personel* (9-11 Nisan 2021).
12. “Sağlık ve Doğa Bilimleri Alanında Lisansüstü Öğrenciler İçin Ulusal TÜBİTAK Projesi Hazırlama ve Yürütme Süreci 2021: Bilim Atölyesi Malatya” 2237-B Proje Eğitimi Etkinliklerini Destekleme Programı, TÜBİTAK 1129B372000665, *Yardımcı Personel* (20-23 Mayıs 2021).
13. “Tıp Fakültesi Lisansüstü Öğrencilerine Yönelik Laboratuvar Hayvanlarında İleri Düzey Deneysel Araştırmalar Kursu” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, *Yardımcı Personel* (31 Mayıs-3 Haziran 2021).
14. “Lisans Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş ve TÜBİTAK 2209 Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Hazırlama Süreci” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, *Yardımcı Personel* (07-10 Haziran 2021).
15. “Sağlık, Doğa Ve Fen Bilimleri Alanı Lisans Öğrencilerine Yönelik Uygulamalı Proje Önerisi Hazırlama, Yürütme Ve Akademik Kazanımlar Eğitimi/3” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, *Yardımcı Personel* (11-14 Haziran 2021).
16. “Sağlık Bilimleri Alanında Lisans Eğitimi Gören Öğrencileri İçin Akademik Becerilere Giriş Ve Proje Eğitimi: TÜBİTAK Bilim Okulu” 2237-A Eğitim Etkinlikleri Destekleme Programı, TÜBİTAK, *Yardımcı Personel* (19-22 Haziran 2021).

### **Katıldığı Kurslar**

1. İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu “21.Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı”, Malatya-2019.
2. Ugo Basile Türkiye Temsilcisi Radon Medikal, “Hot/Cold Plate NG cihaz eğitimi”, Malatya-2020
3. Ugo Basile Türkiye Temsilcisi Radon Medikal, “VF Handheld Electronic Von Frey cihaz eğitimi”, Malatya-2020
4. Ugo Basile Türkiye Temsilcisi Radon Medikal, “Tail-Flick Unit cihaz eğitimi”, Malatya-2020

5. Ugo Basile Türkiye Temsilcisi Radon Medikal, “RotaRod cihaz eğitimi”, Malatya-2020

#### **Katıldığı Bilimsel Etkinlikler & Kongreler**

1. 1. Uluslararası Diyabet Sempozyumu, Gaziantep-2013.
2. Hasan Kalyoncu Üniversitesi Şişmanlık ve Yaşam Kalitesi Üzerine Etkileri Semineri, Gaziantep-2014.
3. Erciyes Üniversitesi 2. Ulusal Beslenme ve Diyetetik Öğrenci Kongresi, Kayseri-2017.
4. Ankara Üniversitesi 2. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi, Ankara-2019.
5. 4th International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, İstanbul-2020

#### **Üye Olduğu Dernekler**

1. Türkiye Nöroendokrinoloji Derneği
2. Türk Fizyoloji Bilimleri Derneği
3. Beyin Araştırmaları Derneği