



**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER SPEKİN
İNfüZYONUNUN HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-
TESTİS AKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**2023
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANATOMİ**

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ**

**İNTRASEREBROVENTRİKÜLER SPEXİN İNFÜZYONUNUN
HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TESTİS AKSI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ

T.C.

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalında

Yüksek Lisans Tezi

Olarak Hazırlanmıştır

KARABÜK

Ağustos 2023

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN tarafından hazırlanan
“İNTRASEREBROVENTRİKÜLER SPEXİN İNFÜZYONUNUN
HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TESTİS AKSI ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı bu tezin
Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ
Tez Danışmanı, Anatomi Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Anatomi Anabilim Dalında Yüksek
Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 21/08/2023

<u>Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)</u>	<u>İmzası</u>
Başkan : Prof. Dr. Evren KÖSE (İNÜ)
Üye : Doç. Dr. Şeyma TOY (KBÜ)
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ (KBÜ)

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans
derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Zeynep ÖZCAN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan eder”

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNTRASEREBROVENTRİKÜLER SPEXİN İNFÜZYONUNUN HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TESTİS AKSİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN

Karabük Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ

Ağustos 2023, 59 sayfa

İnfertilite, dünya genelinde yaklaşık 70 milyon insanı etkileyen önemli bir durumdur. Erkek infertilitesinin bozulmuş spermatogenez, düşük sperm sayısı, anormal sperm morfolojisi, beslenme ve endokrin bozukluklar, alkol ve sigara kullanımı gibi birçok sebebi bulunmaktadır. İnfertiliteyi etkileyen tüm bu sebeplerin erkek üreme fizyolojisinde önemli bir role sahip olan hipotalamus–hipofiz–testiküler (HHT) aksın yapısını da bozduğu ve bunun sonucunda da gonadların fizyolojik seviyede testosteron ve sperm üretememesine neden olduğu bilinmektedir. Spexin (SPX); kemirgenlerin ve insanların merkezi sinir sisteminde, karaciğerinde, gonadlarında ve böbrek gibi birçok periferik dokularında yaygın olarak eksprese edilen bir peptid hormondur. SPX'in insülin salınımında, yağ metabolizmasında, beslenme davranışında ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkin bir nöromodülatör olarak rol oynadığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Son yıllarda ise esas olarak SPX'in üremenin düzenlenmesindeki rolüne odaklanılmıştır. Bu çalışmada SPX'in intraserebroventriküler (icv) infüzyonunun hypothalamus'ta GnRH mRNA

seviyesi, serum LH, FSH ve testosteron seviyesi ve testis dokularında da histopatolojik değişiklikler üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 40 adet Wistar albino sıçan kontrol, sham, Spexin 30 nmol ve Spexin 100 nmol olmak üzere dört gruba ayrıldı. Spexin 30 nmol grubundaki sıçanlara 7 gün boyunca icv olarak 30 nmol/1 µl/saat SPX verilirken spexin 100 nmol grubundaki sıçanlara ise 100 nmol/1 µl/saat SPX verildi. Sham grubundaki sıçanlara ise 7 gün boyunca spexin çözücüsü olarak yBOS verildi. 7. günün sonunda sıçanlar dekapite edilerek kan ve doku örnekleri alındı. Elde edilen kan örnekleri serumlara ayrıldı ve LH, FSH ve testosteron hormon seviyeleri ELISA yöntemiyle belirlendi. Hypothalamus dokusunda GnRH mRNA ifade seviyesi RT-PCR yöntemiyle belirlenirken testis dokularında ise hematoksilen-eozin boyama yöntemiyle seminifer tübül çapı ve epital kalınlığı değerlendirildi.

SPX uygulamasının hypothalamus dokusunda GnRH mRNA ifade seviyesini dozdan bağımsız olarak arttırdığı görüldü ($p<0.05$). Bunun yanı sıra yine SPX uygulanan gruplarda dozdan bağımsız olarak serum LH, FSH ve testosteron hormon seviyelerinin kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel olarak artış gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). Histolojik değerlendirmeler sonucunda SPX uygulamasının seminifer epitel kalınlığı üzerinde gruplar arasında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülürken tübül çapının SPX uygulanan gruplarda artış gösterdiği görüldü ($p<0.05$).

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler, SPX'in hipotalamus-hipofiz-testis aksı aracılığıyla üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli roller oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler : İntraserebroventriküler, Spexin, FSH, LH, GnRH, histopatoloji

Bilim Kodu : 1005

ABSTRACT

Master Thesis

Effects of Intracerebroventricular Spexin Infusion on the Hypothalamus-Pituitary-Testicular Axis

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN

Karabük University

Institute of Graduate Programs

Anatomy

Thesis Advisor

Assist. Prof. Dr. Nesibe YILMAZ

August 2023, 59 pages

Infertility is an important condition affecting approximately 70 million people worldwide. Male infertility has many causes such as impaired spermatogenesis, low sperm count, abnormal sperm morphology, nutrition and endocrine disorders, alcohol and smoking. It is known that all these factors affecting infertility also disrupt the structure of the hypothalamus-pituitary-testicular (HHT) axis, which has an important role in male reproductive physiology, and as a result, the gonads cannot produce testosterone and sperm at physiological level. Spexin (SPX); It is a peptide hormone widely expressed in the central nervous system, liver, gonads and many peripheral tissues of rodents and humans. It has been shown in many studies that Spexin plays a role as an effective neuromodulator in insulin secretion, fat metabolism, nutritional behavior and regulation of reproductive functions. In recent years, the focus has been mainly on the role of spexin in the regulation of reproduction. In this study, the effects of intracerebroventricular (icv) infusion of

spexin on GnRH mRNA level in hypothalamus, serum LH, FSH and testosterone levels and histopathological changes in testis tissues were investigated. For this purpose, 40 Wistar albino rats were divided into four groups as control, sham, Spexin 30 nmol and Spexin 100 nmol. The rats in the spexin 30 nmol group were given 30 nmol/1 µl/hour SPX icv for 7 days, while the rats in the spexin 100 nmol group were given 100 nmol/1 µl/hour SPX. The rats in the sham group were given yBOS as spexin solvent for 7 days. At the end of the 7th day, the rats were decapitated, and blood and tissue samples were taken. Obtained blood samples were separated into sera and LH, FSH and testosterone hormone levels were determined by ELISA method. While the level of GnRH mRNA expression in hypothalamus tissue was determined by RT-PCR method, seminiferous tubule diameter and epithelial thickness were evaluated in testicular tissues by hematoxylin-eosin staining method.

It was observed that SPX application increased the level of GnRH mRNA expression in the hypothalamus tissue independently of the dose ($p < 0.05$). In addition, serum LH, FSH and testosterone hormone levels were statistically increased in the SPX applied groups compared to the control and sham groups, regardless of the dose ($p < 0.05$). As a result of histological evaluations, it was observed that SPX application did not cause any change in seminiferous epithelial thickness between groups, while tubule diameter increased in SPX applied groups ($p < 0.05$).

The data obtained as a result of our study suggest that SPX may play important roles in the regulation of reproductive functions through the hypothalamus-pituitary-testis axis.

Key Words: Intracerebroventricular, Spexin, FSH, LH, GnRH, histopathology

Science Code: 1005

TEŞEKKÜR

Bu tez alıőmasının tamamlanması s¼recinde desteklerini esirgemeyen birçok değerli kiőıye teőekk¼r etmek isterim.

Öncelikle danıőmanım Dr. Öğr. Üyesi Nesibe YILMAZ'a en içten teőekk¼rlerimi sunarım. Sabırlı rehberliği ve akademik bilgi birikimi sayesinde bu tezin baőarıyla tamamlanmasını sağladı. Yönlendirmeleri ve değerli önerileri sayesinde tezim daha nitelikli bir çalışma haline geldi.

Ayrıca, Tezimdeki konuyla ilgili önemli katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Ümit YILMAZ'a da içten teőekk¼rlerimi iletmek istiyorum. Onun değerli görüşleri ve konuya dair uzmanlığı tezimin kalitesini artırmada büyük bir rol oynadı.

Yaőamımda bu günlere gelmemi sağlayan eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan babam Zahiraldin YASİN'e, ve annem Devlet HAMAD'a, sonsuz teőekk¼rlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans tez çalıőmalarım esnasında maddi destek sağlayan Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: KBÜBAP-23-YL004) teőekk¼r ederim.

Hepinizin katkıları ve desteği sayesinde bu tez çalışması gerçekleőtirilebildi. Her birinize içtenlikle teőekk¼r ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	3
GENEL BİLGİLER	3
2.1. TESTİS VE EPİDİDYMİS'İN ANATOMİSİ	3
2.2. TESTİS VE EPİDİDİMİS'İN DAMARLARI VE SİNİRSEL İNNEVASYONU	5
2.3. TESTİS'LERİN HİSTOLOJİSİ	7
2.4. TESTİSLER'İN FİZYOLOJİSİ	9
2.5. SPERMATOGENEZ.....	9
2.6. HYPOTHALAMUS	11
2.6.1. Hypothalamus'tan GnRH Salgılanması.....	13
2.7. GL. HYPOPHYSİALİS (GL. PİTÜİTARY, HİPOFİZ BEZİ)	14
2.7.1. Gl. Hypophysialis'in Anatomisi	14
2.7.2. Gl. Hypophysialis'ten LH ve FSH Salgılanması.....	16
2.8. HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TESTİS AKSİ.....	17
2.9. SPEXİN	19
2.9.1. SPX'in Biyokimyasal Yapısı ve Lokalizasyon.....	19

2.9.2. SPX'in Fizyolojik Fonksiyonları Ve Reseptörleri.....	21
BÖLÜM 3	23
MATERYAL VE METOT	23
3.1. DENEY HAYVANLARI VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	23
3.2. CERRAHİ İŞLEMLER ÖNCESİ YAPILAN HAZIRLIKLAR	24
3.2.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması	24
3.2.2. Beyin İnfüzyon Kitlerinin Ve Ozmotik Mini Pompaların Hazırlanması	24
3.2.3. Sıçanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi Ve Beyin İnfüzyon Kitlerinin Takılması.....	25
3.2.4. Sıçanların Dekapite Edilmesi, Kan Ve Doku Örneklerinin Alınması	27
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	28
3.3.1. Serum FSH Seviyesinin Belirlenmesi	28
3.3.2. Serum LH Seviyesinin Belirlenmesi	29
3.3.3. Serum Testosteron Seviyesinin Belirlenmesi	30
3.4. GENETİK ANALİZLER	32
3.4.1. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi İle Hypothalamus'taki GnRH mRNA Düzeyinin Belirlenmesi.....	32
3.4.2. Toplam RNA'ların Saflığının Ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ..	33
3.4.3 cDNA Sentezi	33
3.4.4. RT-PCR Protokolü	34
3.5. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER	35
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	36
BÖLÜM 4	37
BULGULAR	37
4.1. İcv SPX İNFÜZYONUNUN SERUM LH, FSH VE TESTOSTERON SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİ	37
4.2. İcv SPX İNFÜZYONUNUN HYPOTHALAMUS'TA GNRH MRNA SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİ	40

Sayfa

4.3. İcv SPX İNFÜZYONUNUN SEMİNİFER TÜBÜL KALINLIĞI VE TÜBÜL ÇAPI ÜZERİNE ETKİSİ	41
BÖLÜM 5	44
TARTIŞMA	44
BÖLÜM 6	49
SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50
EK AÇIKLAMALAR A.	57
ETİK KURUL İZİNİ.....	57
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Testis'leri saran tabakalar	4
Şekil 2.2. Testis ve epididymis yapısı	5
Şekil 2.3. Testis'lerin damar yapısı	6
Şekil 2.4. Spermatogenez süreci	11
Şekil 2.5. Hypothalamus'un konumu	12
Şekil 2.6. Hypothalamus'un başlıca nükleusları	13
Şekil 2.7. Hypophysis'in konumu ve komşulukları	15
Şekil 2.8. Adenohypophysis ve Neurohypophysis	16
Şekil 2.9. Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı	18
Şekil 2.10. Tetrapodlarda ve balık modellerinde SPX1 (SPX) kodlama dizisinin organizasyonu	20
(SP: sinyal peptidi; N: asparagin; W: triptofan; T: treonin; P: prolin; S: glutamin; A: alanin; M: metiyonin; L: lösin; Y: valin; K: lizin; G: glisin; SP: sinyal peptidi; RR/KR ve GRR: bölünme yerleri).....	20
Şekil 2.11. Çeşitli türlerde SPX'in amino asit dizisi	20
Şekil 3.1. Osmotik mini pompa ve beyin infüzyon kiti	25
Şekil 3.2. Kafa derisi traş edilen sıçanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi.....	26
Şekil 3.3. Bregma noktası	26
Şekil 3.4. Beyin infüzyon kitinin kafatasına sabitlenmesi ve ozmotik mini pompaların yerleştirilmesi.....	27
Şekil 3.5. FSH ve LH ELISA kitlerinin standart sölüsyonlarının dilüsyonu	29
Şekil 4.1. Spexin infüzyonunun grupların serum LH seviyelerine etkisi	38
Şekil 4.2. Spexin infüzyonunun grupların serum FSH seviyelerine etkisi	39
Şekil 4.3. Spexin infüzyonunun grupların serum testosteron seviyelerine etkisi	40
Şekil 4.4. Spexin infüzyonunun hipotalamustaki GnRH gen ifadesi düzeyi üzerine etkisi	41
Şekil 4.5. Kontrol (A), sham (B), spexin 30 nmol (C) ve spexin 100 nmol (D) gruplarında seminifer tübüllerin görünümü. (H&E; 10x)	42

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3. 1. yBOS hazırlanması için gerekli kimyasallar ve miktarları	24
Tablo 3. 2. Reaksiyon karışımı	34
Tablo 3. 3. RT-PCR analizleri için gereken reaktifler ve miktarları.....	35
Tablo 4. 1. Spexin İnfüzyonun Grupların Serum LH, FSH ve Testosteron Seviyelerine Etkisi	37
Tablo 4. 2. Gruplara ait ortalama seminifer epitel kalınlığı ve tübül çapı	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR

SPX	: Spexin
NPQ	: Nöropeptit Q
HHT	: Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
icv	: İntraserebroventriküler
LH	: Luteinize edici hormon
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
PVN	: Nucleus paraventricularis
ArkN	: Nucleus arcuatus
VMN	: Nucleus ventromedialis
PON	: Nucleus preopticus
SON	: Nucleus supraopticus
GAL	: Galanin peptide
yBOS	: Yapay beyin omurilik sıvısı
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
ELISA	: Enzim bağımlı immnusorbent assay

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Üreme, bir canlının soyunu devam ettirme olayıdır. İnfertilite, kadın veya erkek kaynaklı problemler nedeniyle üreme olayının olmamasıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre infertilite, korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen 12 ay veya daha uzun süre klinik gebeliğin olmaması olarak tanımlanmaktadır. Birçok toplumda evliliğin amaçlarından biri çocuk sahibi olmak olarak algılandığından üreme kültürel, sosyal ve psikolojik bir gerekliliktir (1).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilen infertilite, günümüzde çiftlerin %10-15'ini etkileyen bir sorundur (2, 3). Amerikan Ulusal Sağlık İstatistikleri Merkezi tarafından 2017 yılında elde edilen veriler, 15-44 yaş arası evli kadınlarının %14,2'sinin infertil olduğunu göstermektedir (4). 2013 yılında yayınlanan doğurganlık rehberi verilerine göre İngiltere'de her 7 çiftten 1'inde infertilite sorunu vardır (5). Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması sonuçları, 30 yaşın altındaki evli kadınların %48'inin aile planlaması uygulamama nedeni olarak gebe kalamama veya infertilite olduğunu göstermiştir (6). Çeşitli çalışmalar sonucunda erkek infertilitesinin birçok nedeni olduğu gösterilmiştir. Bunlar arasında defektif spermatogenez, düşük sperm sayısı, anormal sperm morfolojisi, beslenme ve endokrin bozukluklar, alkol ve sigara kullanımı sayılabilir. Bu nedenler infertiliteye yol açar ve erkek üreme fizyolojisinde önemli bir role sahip olan hypothalamus-hypophysis-testis (HHT) aksının yapısını bozar (7). HHT aksının bozulması, gonadların fizyolojik düzeyde testosteron ve sperm üretememesine neden olur (8). HHT aksının temel görevi, erkek üreme sisteminde yer alan hormonların salgılanmasını kontrol etmek, sağlıklı sperm hücrelerinin oluşumunu ve olgunlaşmasını sağlamaktır (9). HHT aksı üzerinde yer alan hypothalamus, ön hipofiz bezini (adenohypophysis) uyaran gonadotropin salgılatıcı hormonu (GnRH) salgılar (10). Portal sistem vasıtasıyla uyardığı ön hipofiz bezinden gonadotropik

hormonlar olan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salgılanmasını gerçekleştirir. Ön hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH, testislerdeki hedef hücrelerde siklik adenozin monofosfat (cAMP) ikinci haberci sistemini aktive ederek hücresel düzeyde etkisini gösterir. FSH hormonu, testislerde bulunan sertoli hücrelerini seks hormonu bağlayıcı globülin salgılaması ve spermatogenez gerçekleştirmesi için uyarır. LH salgılanması ise leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımını uyarır (11). Peptit hormonları; küçük, işlenmiş ve salgılanan peptitler olup membran reseptörleri yoluyla sinyal verirler. Bu hormonların normal ve patolojik fizyolojide kritik rolleri vardır (12). Spexin (SPX), modern biyoinformatik arama stratejileri aracılığıyla tanımlanan bir nöropeptittir. SPX'in işlevi hakkında sınırlı bilgi vardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, SPX'in adrenokortikal hücre proliferasyon oranını azalttığını ve bazı sıçanların adrenokortikal hücre kültürlerinde aldosteron ve glukokortikoid sekresyonunda bir artışa neden olabileceğini, kardiyovasküler ve renal fonksiyonları ile nosiseptifi modüle edebileceğini göstermiştir. Japon balıklarının SPX ile tedavisinin, luteinize edici hormonun salgılanmasını azalttığı ve iştahı bastırdığı da gösterilmiştir. SPX'in fizyolojik rolleri için biriken kanıtlara rağmen, diğer işlevleri henüz gösterilmemiştir. İnsanlarda SPX eksprese eden doku veya hücre tiplerinin tanımlanması, fizyolojik işlevinin açıklığa kavuşturulmasına katkıda bulunacaktır (13). SPX, omurgalılarda yeni keşfedilen bir nöropeptittir. Biyolojik işlevlerini ortaya çıkarmak için kapsamlı karşılaştırmalı çalışmalar gereklidir (14).

Bu çalışmada, intraserebroventriküler (icv) SPX infüzyonunun, üreme sisteminde önemli bir yeri olan HHT aksında yer alan hypothalamus'ta GnRH mRNA seviyesi, serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri ve testis dokusunda histopatolojik değişiklikler üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

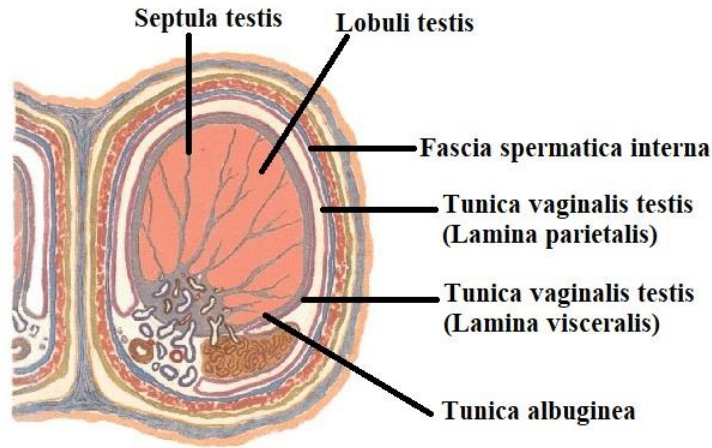
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1.TESTİS VE EPİDİDYMİS'İN ANATOMİSİ

Testis'ler erkek üreme sistemine ait bir organdır. Başlangıçta abdominal duvarın arka-üst kısmında gelişen testis'ler doğumdan hemen önce, abdominal duvarın ön kısmındaki canalis inguinalis'ten geçerek scrotum'a iner. İniş sırasında testisler damarlarını, lenfatiklerini, sinirlerini ve ana drenaj kanalları olan ductus deferens (vas deferens)'leri de birlikte taşır. Testis'lerin lenf drenajı bu nedenle inguinal veya pelvik lenf düğümlerine değil, karın bölgesindeki lateral aortik veya lumbal düğümlere ve preaortik düğümlere yöneliktir. Elipsoid şekilli olan testis'ler, funiculus spermaticus adı verilen bir bağ ile scrotum içerisinde asılı olarak bulunurlar (15, 16).

Testis'ler scrotum içerisinde dıştan-içe doğru üç tabaka ile sarılıdır; tunica vaginalis testis, tunica albuginea ve tunica vasculosa. Tunica vaginalis testis, testis'lerin dış yüzünü örten seröz bir zarıdır. Ayrıca bu seröz zar fascia spermatica interna'nın da iç yüzünü sarar. Embriyonel dönemde abdomen boşluğunu örten peritoneum parietale, scrotum'a doğru saccus vaginalis adı verilen bir çıkıntı gönderir. Testis'ler, fascia spermatica interna'ya gevşek olarak bağlanmış olan bu çıkıntı içine arka kısımdan gömülerek periton ile kaplanır. Saccus vaginalis'in testis'leri örten kısmına lamina visceralis ya da epiorchium adı verilmektedir. Fascia spermatica interna'ya yapışan kısmı ise lamina parietalis ya da periorchium adını alır. Yetişkin bireylerde saccus vaginalis'in bu iki yaprağına tunica vaginalis testis denilmektedir (Şekil 2.1) (15, 17).

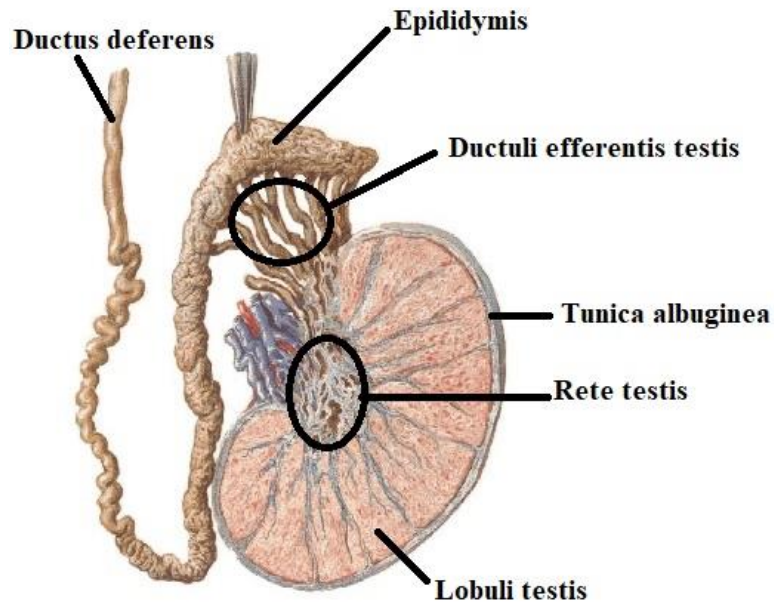


Şekil 2.1. Testis'leri saran tabakalar (18)

Testis'leri saran tunica albuginea tabakası, seminifer tübüllerden, interstisyel dokudan ve kalın bir bağ dokusundan meydana gelen sıkı, fibröz bir tabakadır. Mavimsi-beyaz renkli bu tabakada yer alan seminifer tübüller tarafından sperm hücreleri üretilmektedir. Testis'lerin arka kenarında tunica albuginea tabakasının üst kısmı tunica vaginalis testis ile sarılı değildir. Peritonun bulunmadığı bu alanda epididymis bulunmaktadır. Ayrıca testis'lerin damar ve sinir yapıları da bu kısımdan girip çıkar. Tunica albuginea tabakası, peritonun bulunmadığı arka kenardan testis'lerin içerisine dikey yönlü ve bağ dokusundan oluşan yarım bir bölme gönderir. Mediastinum testis adı verilen bu bölme, testis'lerin üst ucundan alt ucuna doğru uzanır ve testis dokusu içerisine septula testis denilen bölmeler gönderir (Şekil 2.1). Bu bölmeler testis dokusunu lobuli testis denilen bölmelere ayırır. Her bir lopçuk içerisinde tubuli seminiferi contorti ve recti adı verilen kıvrımlı bezler bulunur. Testis dokusu içerisinde 400-600 adet tubuli seminiferi contorti bulunmaktadır ve bunlar mediastinum testis'e doğru uzanırken 20-30 adet tubuli seminiferi recti denilen düz tübüllere dönüşürler. Tubuli seminiferi recti'ler mediastinum testis içerisinde birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis (Haller ağı) denilen ağı meydana getirirler. Mediastinum testis içerisinde üst kısımlara doğru uzanırlar ve burada ductuli efferentes testis denilen kanalcıklara dönüşürler. Testis dokusu içerisinde seminifer tübüllerde üretilen sperm hücreleri bu şekilde testis'lerin arka-üst kısmına kadar taşınır. Ductuli efferentes testis'ler bu bölgede tunica albuginea'yı delip dışarı çıkar ve epididymis'in baş kısmındaki ductus epididymis

denilen kanallar aracılığıyla sperm hücrelerini epididymis'e aktarır (Şekil 2.2) (15, 17).

Testis'leri en içten saran tabaka olan tunica vasculosa, testis'leri saran bir damar ağıdır. Bu tabakadaki damarlar arasındaki boşlukları gevşek bir bağ dokusu doldurmaktadır. Testis dokusu içerisindeki tüm lopçuklar tunica vasculosa tabakası tarafından sarılmıştır (15).



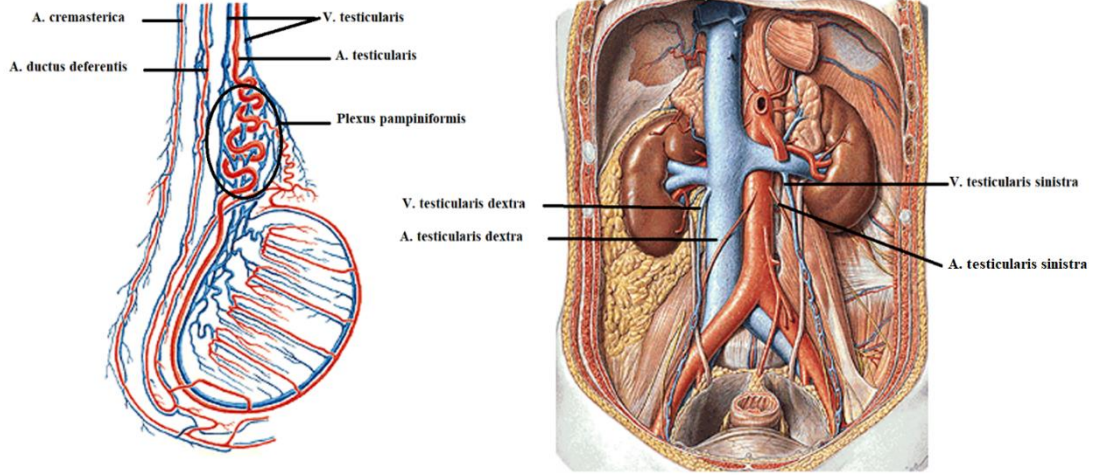
Şekil 2.2. Testis ve epididymis yapısı (18)

2.2. TESTİS VE EPİDİDİMİS'İN DAMARLARI VE SİNİRSEL İNNERVASYONU

Aorta abdominalis'in bir dalı olan a. testicularis'ler, testis'lerin beslenmesini sağlayan esas damardır (Şekil 2.3). Bunun yanı sıra a. ductus deferentis, a. cremasterica ve aa. pudendae externae'lar da a. testicularis ile birleşerek testis dokusunun beslenmesine katkı sağlamaktadır (17, 19).

Testis'lerin venöz drenajı v. testicularis'ler tarafından sağlanmaktadır. Testis dokusundan çıkan birçok küçük ven, epididymis'ten gelen küçük venler ile birleşerek

plexus pampiniformis'i meydana getirmektedir. Anulus inguinalis profundus seviyesinde bu plexus birleşerek sağlı sollu v. testicularis'leri oluşturmaktadır. Canalis inguinalis'ten geçerek karın boşluğuna gelen v. testicularis'lerden de sağdaki v. cava inferior'a, soldaki ise v. renalis sinistra'ya drene olur (Şekil 2.3) (19).



Şekil 2.3. Testis'lerin damar yapısı (20)

Testis'lerin tunica vaginalis testis'in yüzeyselinden kaynaklanan yüzeysel venleri ile epididymis ve testis dokusundan kaynaklanan derin venleri birleşir ve funiculus spermaticus boyunca yükselerek karın boşluğuna gelir. Karın boşluğu içerisinde sağda ve solda v. testicularis'leri takip ederek aorta'nın ön ve yan taraflarındaki lenf düğümlerine (lumbal ve para-aortik lenf düğümleri) drene olurlar. Bu durum aslında, embriyolojik gelişim sırasında testis'lerin abdominal duvarın arka-üst kısmında gelişmesinden ve scrotum içerisine inerken kan ve lenf damarlarını da birlikte sürüklemesinden kaynaklanmaktadır (15, 19).

Testis'lerin sempatik lifleri medulla spinalis'in T10.-12. segmentlerinden gelir. Presinaptik sempatik lifler ganglion aorticorenale ya da ganglion mesenterica superior'daki postsinaptik nöronlarla sinaps yaparlar. Bu ganglionlardan çıkan postsinaptik sempatik lifler ise damarların etrafındaki pleksuslarla testis'lere ulaşır ve testislerdeki kan damarlarını, düz kas hücrelerini ve interstisyel hücreleri innerve eder (15). Parasempatik lifler testis'lere medulla spinalis'in S2-4. segmentlerinden n. splanchnicus pelvici'ler aracılığıyla gelmektedir. Plexus hypogastricus inferior ve plexus testicularis ile testis dokusuna gelen parasempatik lifler düz kas hücrelerini ve

kan damarlarını innerve eder. Testis'lerin somatik innervasyonu ise n. genitofemoralis (L1-L2) ve n. ilioinguinalis (L1) ile sağlanır. Bu sinirler, testis'lerin duyuşal fonksiyonlarından sorumludur ve ağrı, basınç ve sıcaklık gibi duyuları taşırlar (15, 17).

2.3. TESTİS'LERİN HİSTOLOJİSİ

Her bir testis yaklaşık 250 adet lobuli testis'lerden oluşmaktadır. Lobuli testis'ler, testosteron salgısından sorumlu Leydig hücrelerinden (endokrin interstisyel hücreler), sperm üretiminin meydana geldiği seminifer tübüllerden (tubuli seminiferi contorti) ve interstiyel dokudan meydana gelmektedir (21). Bu yapıların ve hücrelerin aralarındaki etkileşimler, testis'lerin üreme sistemi içindeki işlevlerinin düzenlenmesine ve devamlılığına katkıda bulunurlar (22).

İnterstisyel doku, testis'lerde seminifer tübüller arasından bulunan ve testis'lerin büyük bir kısmını oluşturan seyrek bağ dokusudur. Bu doku kan ve lenf damarlarını, sinirleri, fibroblastları ve Leydig hücrelerini içermektedir (23). Testis'lerdeki hücrelerin beslenmesi ve oksijen alımı için gerekli olan kan akışını sağlayan bu doku, ayrıca spermatogenez süreci ve Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimi için uygun bir mikroçevre yaratmaya katkıda bulunur (24).

Seminifer tübüller, testis'lerin ana fonksiyonel yapıları olup sperm üretimi bu hücrelerde gerçekleşmektedir. Testis'lerin toplam hacminin yaklaşık %90'ını oluştururlar (25). Her tübül, germ hücreleri ve Sertoli hücreleri içeren germinal epitel ile kaplıdır. Germ hücreleri, spermatogenez sürecinde sperm hücrelerine dönüşürken, Sertoli hücreleri, spermatogenez ve spermiyogenez süreçlerinin düzenlenmesinde görev alır (26).

Testis'lerin endokrin hücreleri olarak görev yapan Leydig hücreleri, spermatogenez sürecinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan testosteron hormonunun üretiminden sorumludur. İnterstiyel dokuda bulunan ve luteinize edici hormon (LH) tarafından uyarılan bu hücreler, testis dokusunun %20'sini oluşturmaktadır. Testosteron sentezi, hypothalamus'un gonadotropin salgılayıcı hormonunu (GnRH)

üretmeye başladığı ergenlik döneminde başlar. Testosteron, testis’lerde ve diğer hedef dokularda androjen reseptörleriyle etkileşerek spermatogenez ve sekonder cinsiyet özelliklerinin düzenlenmesine katkıda bulunur (27, 28).

Sertoli hücreleri ise, spermatogenez ve spermiyogenez süreçlerinin düzenlenmesinde görev alır ve germ hücrelerine hücrel destek, koruma ve beslenme sağlar (29). Sertoli hücreleri, hücre büyümesi ve farklılaşma için gerekli olan plazma faktörlerini sağlarken, spermatogenetik hücreleri dolaşan bağışıklık bileşenlerinden korur. Testis’lerdeki bağışıklık bariyerini oluşturarak germ hücrelerini bağışıklık sisteminden koruyan bu hücrelerin fonksiyonları folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron tarafından düzenlenir (28, 30).

Sertoli hücreleri, testis dışındaki yeni spermleri taşıyan suyu sürekli olarak seminifer tübüllere bırakır. FSH tarafından uyarılan besin maddelerinin üretimi ve androjen bağlayıcı protein (ABP), spermiyogenez için gerekli olan testosteron seviyesini yoğunlaştırır. Endokrin hücreler olarak, ön hipofiz bezini geri besleyerek FSH sentezini ve salınımını baskılayan 39 kDa’lık glikoprotein inhibini salgırlar. Spermiyogenez sırasında artık sitoplazma, geride kalan cisimler olarak atılır ve Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından fagosite edilerek sindirilir. Sperm proteinlerinin hiçbiri normalde kan-testis bariyerinin geri tarafından geçmez (29).

Leydig ve Sertoli hücreleri arasındaki etkileşimler, testis’lerin düzgün çalışması için önemlidir. Özellikle, Leydig hücrelerinin ürettiği testosteron, Sertoli hücrelerinin reseptörleri aracılığıyla spermatogenezin düzenlenmesinde etkilidir (31). Sertoli hücreleri ayrıca, inhibin ve aktivin gibi bazı peptid hormonlar salgılayarak, hypothalamus ve gl. hypophysialis üzerinden geri besleme mekanizmalarıyla testosteron ve FSH üretimini düzenler (32).

Seminifer tübüllerin epitelinde bulunan spermatojenik hücreler, düzenli bir şekilde bölünerek olgun sperm hücrelerine dönüşen olgunlaşma aşamasındaki hücrelerdir. 4-8 katlı bir tabaka şeklinde olan bu hücreler, bazal laminadan lümene doğru yönelmişlerdir. Spermatojenik hücreler kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar ve seminifer tübüllerin bazal laminalarından lümene doğru sırasıyla spermatogonyum, spermatozoid, spermatozoid ve spermium şeklinde bulunmaktadır (33).

2.4. TESTİSLER'İN FİZYOLOJİSİ

Testis'ler, erkek üreme fizyolojisinde yer alan organların ilkidir. Erkek üreme hücresi olan spermlerin sentezlendiği ve depolandığı bir organ olan testisler, spermatogenezden ve testosteron hormonunun salgılanmasından sorumludur. Testis'lerde üretilen sperm hücreleri bir kaç gün içinde epididymis'e taşınır ve burada depolanır (34).

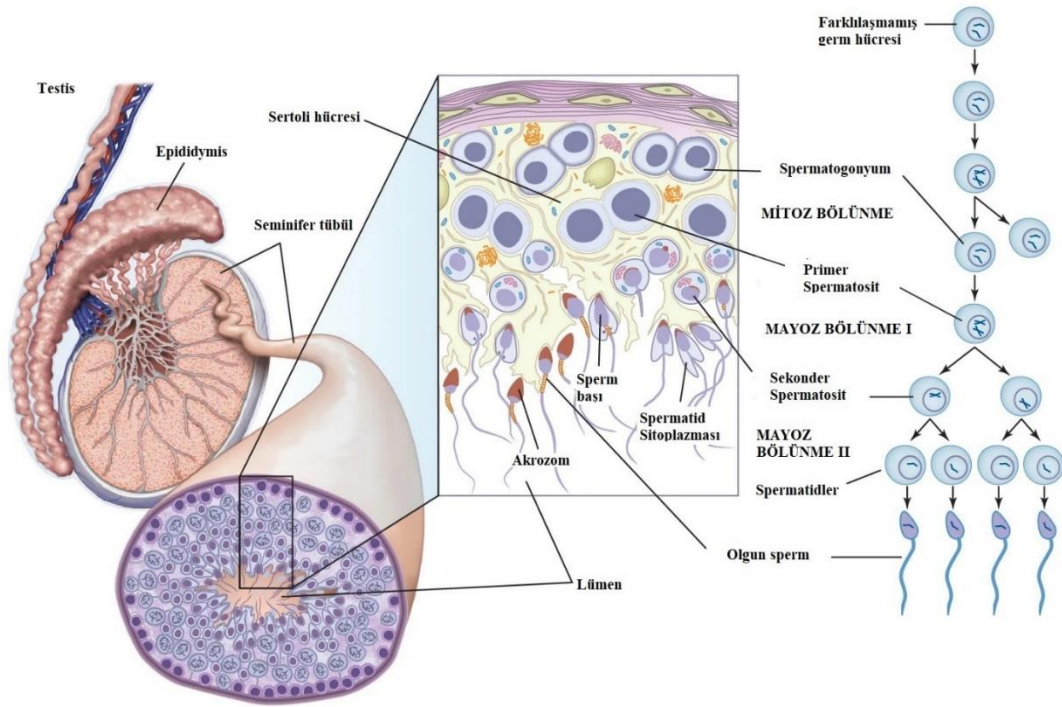
Hypothalamus'tan salgılanan pulsatil GnRH, adenohipofiz'den LH hormonun salgılanmasında rol oynamaktadır. Adenohipofiz'den salgılanan LH ise, seminifer tübülde yer alan Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını uyarır (35). Testosteron, insan yaşamının üç aşamasında zirve yapar. İlk aşama, testis'lerin oluştuğu ve erkek genital bezlerinin geliştiği fetal dönemdir. İkinci aşama, doğumdan itibaren geçen ilk iki aydır ve fetal dönemde gelişen gonadlar olgunlaşır. Ergenliğe kadar, testosteron dinlenme aşamasına girer. Son aşama ise ergenlik dönemidir ve bu dönemden itibaren tekrar zirve yapan testosteron yaşam boyu devam eder. Testosteron, erkeklerde ikincil cinsiyet özelliklerinin oluşumuna izin veren bir androjen görevi görür (34). Testosteron'un etkisiyle erkeklerde meydana gelen değişiklikler arasında kıllanma, ses kalınlaşması, kas kütlesi ve kemik yoğunluğunun artması ve metabolizma hızının artması yer alır (34). Sabahları daha yüksek konsantrasyonlarda ve öğleden sonra daha düşük konsantrasyonlarda olan günlük bir ritim, sağlıklı genç erkeklerde testosteron salgılanmasını karakterize eder (36). Birçok çalışma, yaşlı erkeklerde testosteron'un günlük ritminin azaldığını ortaya koymuştur (37). Testosteron konsantrasyonundaki yaşa bağlı azalma oranı kronik hastalıklar, obezite ve ilaçlar gibi faktörlerden etkilenebilir. Epidemiyolojik çalışmalar, düşük testosteron seviyelerinin ve vücut kompozisyonundaki, fiziksel fonksiyondaki ve hareketlilikteki değişikliklerin; T2DM, metabolik sendrom, koroner arter hastalığı ve kırık gelişme riski oluşturduğunu göstermektedir (38).

2.5. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, spermatogonyum adı verilen nispeten farklılaşmamış bir diploid hücrenin, spermatozoon adı verilen oldukça özelleşmiş bir haploid hücreye yavaş

yavaş evrimleştığı oldukça karmaşık bir zamansal olaydır (39). Ergenlik dönemi ile başlayan spermatogenez süreci, ön hipofizden gonadotropik hormonların salgısının uyarılması sonucu başlar ve seminifer tübüllerde meydana gelir. Testosteron varlığı ile gerçekleşen spermatogenez, ergenliğin başlangıcından yaşamın sonuna kadar devam eden karmaşık bir olaydır (40). Sertoli hücreleri spermatogenez sürecinde kritik öneme sahip olup testiküler cinsiyetin erkek yönünde gelişimini sağlar. Bazal laminadan seminifer tübüllere kadar uzanan Sertoli hücreleri, spermatogenezde germ hücreleri ile etkileşime girdikleri gibi, birbirleriyle de güçlü bağlantılar oluşturur. Hücreler arasındaki bu bağlantılar kan-testis bariyerini oluşmasını sağlarlar. Sertoli hücreleri ayrıca inhibin hormonunu sentezleyerek ön hipofiz bezinden gonadotropin salgılanmasını baskılar (41).

Ortalama bir kişide 74 gün süren spermatogenez olayının, başlaması ve devam ettirilmesi gl. hypophysialis'ten salgılanan FSH ve LH'nın kontrolü ile olmaktadır (42). Süreç, spermatositogenez ve spermiyogenez şeklinde iki temel aşamada gerçekleşir. İlk aşamada spermatogonyum adı verilen kök hücreler, Sertoli hücrelerinden geçerek sıkı bağlantı noktasını atlayarak seminifer tübül lümenine geçer. Spermatositogenez aşamasında olan spermatogonyumun bu ilerleyişinde gerekli fiziksel destek ve beslenme desteği Sertoli hücreleri tarafından sağlanır. Spermatogonyumlar mitotik bölünmeye uğrar ve önemli bir değişim aşamasına girer. Mitoz bölünmesinden sonra oluşan hücreye birincil spermatosit denir. Her birincil spermatosit, mayozun bir sonucu olarak iki ikincil spermatosit oluşturur. Daha sonra sekonder spermatositler de mayoz geçirir ve dört spermatid oluşturur. İkinci aşamada spermatidler olgunlaşır ve sperm hücresini oluşturur. Spermatidler başlangıçta işlevsel değildir. Spermatogenez birkaç gün içinde kuyruk oluşumu, akrozom ve spermatidlerde çekirdek gelişimi ile tamamlanır (Şekil 2.4) (42).



Şekil 2.4. Spermatogenez süreci (43)

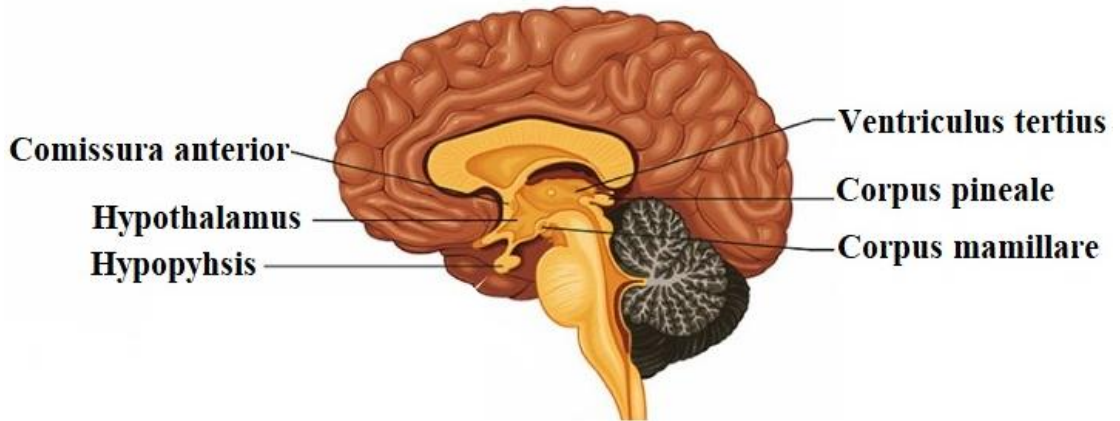
Spermatogenez sonucu oluşan olgun spermatozoid hücrelerinde kuyruk oluşumu meydana gelir ancak bu hücrelerin hareket yetenekleri sınırlıdır. Olgun spermatozoidler epididymis'te birkaç gün depolanır ve hareket etme yeteneği kazanır. Hareket etme yeteneği kazanmış olan bu hücrelere artık spermatozoon adı verilmektedir (34, 44). Olgun bir spermatozoid baş, boyun ve kuyruk bölgesi olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Baş bölgesinde spermatozoid hücrelerinin genetik bilgisini taşıyan bir çekirdek bulunur. Spermatozoid hücrelerinin boyun kısmı, hücrenin enerji deposu görevi görür. Kuyruk kısmı ise yapısındaki kirpikler sayesinde oosite doğru hareket sağlar. Bu nedenle, spermatozoid kalitesinin en kritik göstergeleri spermatozoid sayısı, yaşayabilirliği ve ilerleyici hareketliliğidir. Spermatozoidin progresif hareketliliği, spermatozoidin oosite hareketi için gereklidir (45, 46).

2.6. HYPOTHALAMUS

Hypothalamus, üçüncü ventrikülün her iki yanında ve thalamus'un hemen altında yer alan, beynin küçük bir parçasıdır. Gl. hypophysialis'in hemen üzerinde bulunan bu yapı, toplam beyin hacminin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır (Şekil 2.5). Çok

küçük bir yapı olmasına rağmen endokrin fonksiyonların ve homeostatik dengenin çok önemli bir düzenleyicisidir (47).

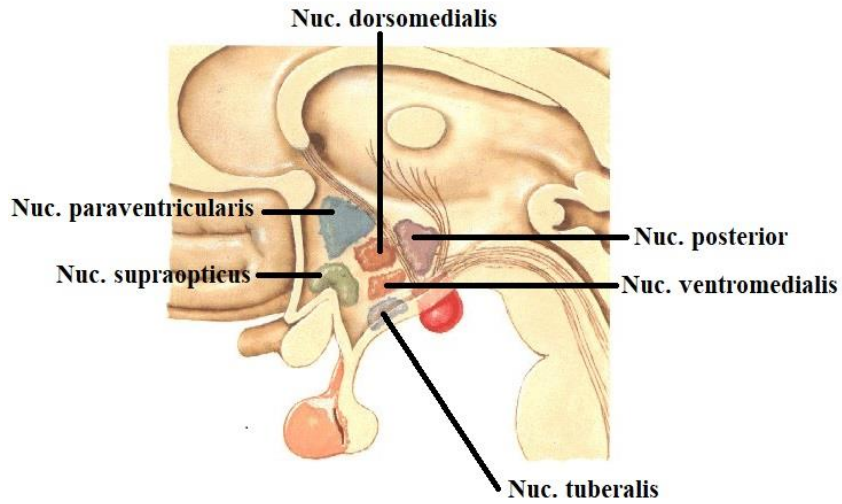
Vücudun iç ortamının kimyasal dengesini ve sıcaklığını koruyan karmaşık otonom mekanizmalarının çoğu hypothalamus'ta yer almaktadır. Bunun yanı sıra, duygusal ve içgüdüsel davranışları düzenlemek için limbik sistemle birlikte çalışmaktadır (34). "Otonom sistemin baş ganglionu" olan hypothalamus; iştahı, susuzluğu, duygusal tepkiyi, cinsel isteği ve daha fazlasını düzenlemekten sorumludur. Aynı zamanda otonom sinir sisteminin işleyişini de (nabız, kan basıncı, solunum ve uyarılma) düzenlemektedir (34). Diencephalon'un ön-alt kısmında yer alan hypothalamus, merkezi sinir sistemi ile endokrin sistem arasında bağlantı sağlayarak vücudun iç dengesini ayarlamaktadır (34).



Şekil 2.5. Hypothalamus'un konumu (43)

Hypothalamus çeşitli nükleuslara ve nükleer bölgelere ayrılmıştır (Şekil 2.6). Nükleusları, mediallyden-laterale doğru üç bölgede yer almaktadırlar. 3. ventriküle yakın olan bölge periventriküler bölgeyi, buranın dış kısmındaki alan medial bölgeyi, en dışta kalan alan ise lateral bölgeyi oluşturmaktadır (48). Hypothalamus'ta, nöronal gövdeler çekirdekler halinde düzenlenmiştir. Bu karmaşık nöronal bağlantı sistemi, hipotalamik nöronlar ve diğer beyin bölgeleri arasında sürekli iletişim sağlar. Hipotalamik çekirdekler, anatomik konumlarına veya hücreleri tarafından üretilen temel nöropeptitlere göre sınıflandırılabilir. Bununla birlikte, bazı hipotalamik çekirdekler, birden fazla nöronal hücre tipi içerebileceğinden, birden fazla işleve

sahip olabilir. Hypothalamus'ta bulunan nucleus paraventricularis (PVN), nucleus arcuatus (ArkN) ve nucleus ventromedialis (VMN) gıda alımının düzenlenmesinde rol oynayan esas nükleuslardır. Östrojen ve androjene duyarlı afferent nöronlar sayesinde hypothalamus'ta bulunan ArkN, nucleus preopticus (PON) ve nucleus supraopticus (SON) hem kadınlarda hem de erkeklerde GnRH hormonunu salgılayarak cinsel davranışı kontrol eder (49, 50). GnRH dışında hypothalamus'tan salgılanan diğer hormonlar; tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), büyüme hormone salgılatıcı hormon (GHRH), prolaktin salgılatıcı hormon (PRF) ve melanosit stimulan hormon salgılatıcı faktör (MSHRH)'dür. Hypothalamus salgıladığı bu hormonlar aracılığıyla gl. hypophysialis'i uyarmakta ve fizyolojik cevapların oluşmasını sağlamaktadır (48).



Şekil 2.6. Hypothalamus'un başlıca nükleusları (18)

2.6.1. Hypothalamus'tan GnRH Salgılanması

Endokrin bezlerinin sentezlediği ve kana verdiği kimyasal maddelere hormon adı verilmektedir. Hypothalamus, nöroendokrin kontrolünü salgıladığı hormonlar aracılığıyla gl. hypophysialis'in hormon salgılamasını sağlayarak yapmaktadır. Nucleus arcuatus'ta bulunan her hormon için salgılanan salgılatıcı hormon (RH, releasing hormon) ve baskılayıcı hormon (IH, inhibiting hormon) nöronal bir yol ile (tractus tuberohypophysialis) hipofizial portal sisteme taşınır. Adenohypophysis'i

(ön hipofizi) etkileyen bu hormonlar, tropik hormonların salgısını düzenlemektedir (47).

Hypothalamus'un preoptik alanından salgılanan GnRH, hypothalamus'tan adenohypophysis'e taşınarak ergenliğin başlamasını sağladığı gibi her iki cinsiyette de cinsel işlevleri kontrol etmektedir (10). GnRH'nın biyokimyasal yapısı 10 amino asitten (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) oluşmaktadır. GnRH, hypothalamus'un ArN, PVN, MPN (medial preoptic nükleus) ve SON çekirdeklerinden adenohypophysis'e ulaşmak için hipofizyal portal dolaşıma salınır (34). Vücutta GnRH hormonu salgılanması pulsatil ve dalgalıdır (1-2 saatte bir, 15-25 dk salgılanır). İlbahar mevsiminde ve sabanım erken saatlerinde muhtemelen melatonin ile ilişkili olarak GnRH salgısının en yüksek seviyeye çıktığı bilinmektedir. İstisnai olarak dişi üreme döngüsünün preovuluar aşamasında GnRH salınımı süreklidir (51).

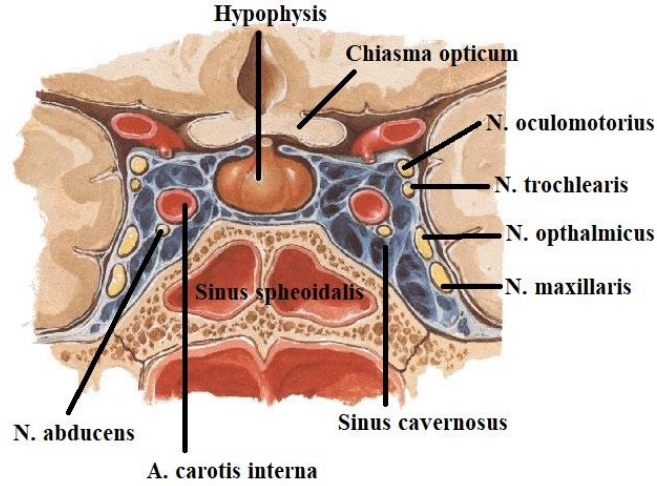
Hipofizyal portal dolaşım yoluyla gl. hypophysialis'e taşınan GnRH, bu bezdeki spesifik bir hücre türü olan gonadotropinler üzerindeki reseptörlerine bağlanarak gonadotropinlerin (LH ve FSH) sentezini ve salgılanmasını düzenler. Gonadotropinler de sistemik dolaşıma salınır. Daha sonra, erkeklerde gonadotropinler, spermatogenez ve androjen biyosentezini düzenlemek için testis'lere etki eder (52, 53).

2.7. GL. HYPOPHYSIALİS (GL. PİTUİTARY, HİPOFİZ BEZİ)

2.7.1. Gl. Hypophysialis'in Anatomisi

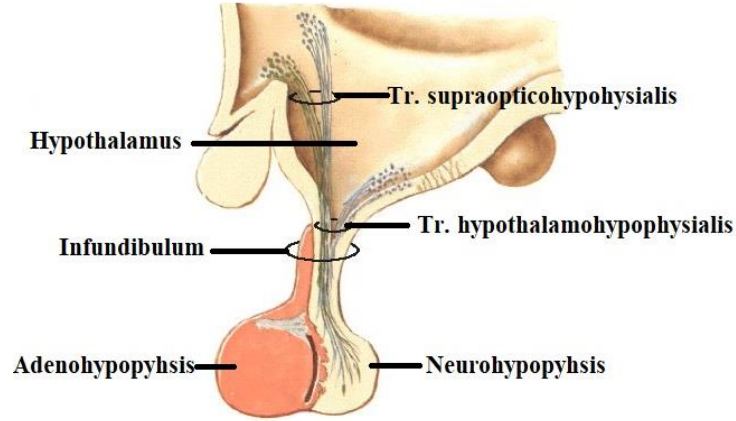
Hypothalamus'un alt kısmında bulunan gl. hypophysialis, sfenoid kemikte fossa hypophysialis denilen çukur alanda bulunmaktadır. Infundibulum denilen bir sap aracılığıyla hypothalamus'a bağlanmıştır. Bezin üst yüzü dura mater uzantısı olan ve diaphragma sellae denilen bir örtü ile örtülüdür. Yaklaşık olarak 0,5-1 gr ağırlığında olan bu bez, hypothalamus ile birlikte endokrin bezlerin fonksiyonlarını düzenlemektedir (Şekil 2.7) (48, 54).

Gl. hypophysialis, anatomik konumu itibariyle önemli yapılarla da komşuluk yapmaktadır. Bezin ön-alt kısmında sinus sphenoidalis, ön-üst kısmında ise chiasma opticum yer almaktadır. Yanlarda ise sinus cavernosus'lar ve içinden geçen bazı kranial sinirler ve a. carotis interna ile komşuluk yapmaktadır (Şekil 2.7) (54).



Şekil 2.7. Hypophysis'in konumu ve komşulukları (18)

Gl. hypophysialis, neurohypophysis (lobus posterior) ve adenohypophysis (lobus anterior) olmak üzere iki lobdan oluşmuştur (Şekil 2.8). Nörol ektodermden gelişen neurohypophysis kısmından hormon sentezi olmamaktadır. Eminentia mediana aracılığıyla hypothalamus'a bağlanan bu bölümde hypothalamus'tan salgılanan vasopressin (antidiüretik hormon) ve oksitosin hormonları depo edilir ve salgılanır. Oksitosin hormonu doğumun gerçekleşmesini sağlarken vasopressin böbreklerden suyun geri emilimini sağlar (48).



Şekil 2.8. Adenohypophysis ve Neurohypophysis (18)

Ağız boşluğu ektoderminden gelişen adenohypophysis'ten ise hypothalamus'tan salgılanan salgılatıcı hormonların etkisi ile birçok hormon salgılanmaktadır. Bu hormonlar; büyüme hormonu (GH), tiroid uyarıcı hormon (TSH), gonadotropik hormonlar (FSH, LH), doğumdan sonra süt üretimini sağlayan prolaktin (PRL) ve gl. suprarenalis'lerde kortizol salınımını uyararak adrenokortikotropik hormon (ACTH)'dur (Şekil 2.8) (34).

2.7.2. Gl. Hypophysialis'ten LH ve FSH Salgılanması

Hypothalamus'tan salgılanan GnRH, adenohypophysis'ten FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını uyarmaktadır. Bu hormonların üreme sistemi üzerinde önemli rolleri bulunmaktadır. Ovaryumlar ve testis'ler üzerinde etki gösteren FSH, yumurta ve sperm hücrelerinin olgunlaşmasında rol oynarken aynı zamanda da seks hormonlarının üretimini de düzenlemektedir. FSH, testisler'deki seks hormonu bağlayıcı globulin salgılanmasını ve spermatogenezi düzenleyen Sertoli hücrelerini uyarır.

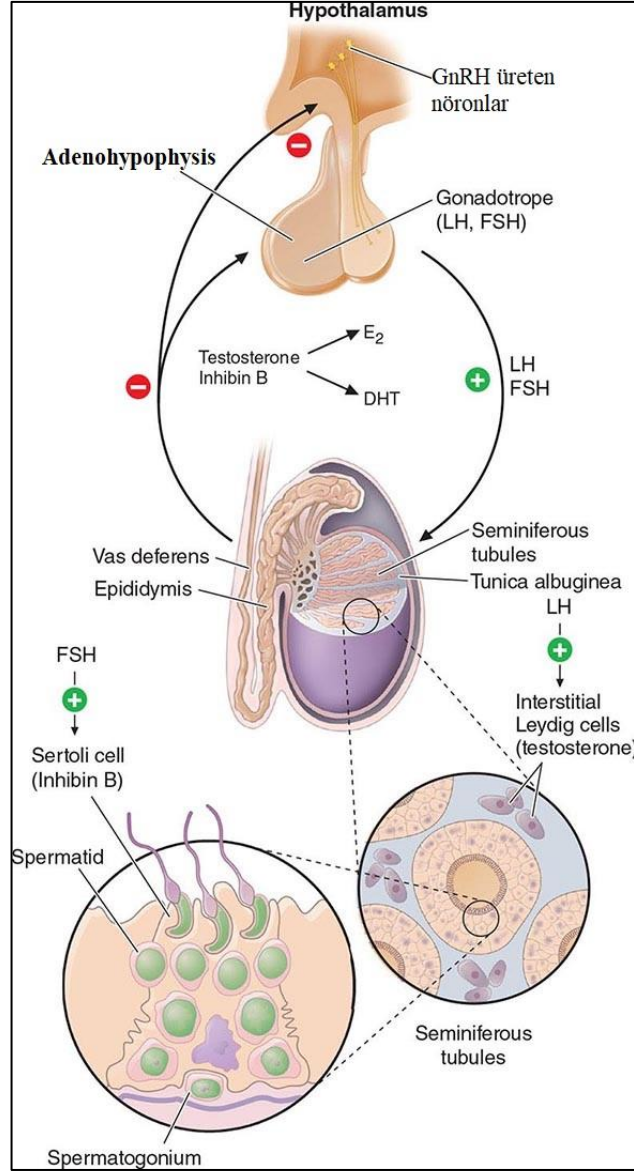
Adenohypophysis'ten salgılanan bir başka gonadotropik hormon olan LH, testis'lerdeki Leydig hücrelerini uyarak testosteron salgılanmasını uyarır. Bu hormon kadınlarda ise ovulasyon sürecinde rol oynamakta ve ovaryumlarda östrojen ve progesteron hormonlarının salgılanmasını sağlamaktadır (49).

Yaşla birlikte azalan GnRH sekresyonunun aksine, LH ve FSH serum seviyeleri yaşlı erkeklerde genç erkeklere göre daha yüksektir. LH ve FSH hormonları cAMP yolunu aktive ederek testis’lerdeki Leydig ve Sertoli hücrelerini etkiler. cAMP sekonder haberci sistemini kullanan bu hormonlar, testosteron salgılanmasını ve spermatogenezi uyarır (34).

2.8. HİPOTALAMUS-HİPOFİZ-TESTİS AKSI

Sağlıklı erkeklerde ergenliğin başlamasından ve üreme fonksiyonlarının gelişmesinden sorumlu olan hypothalamus, gl. hypophysialis ve testis’ler birbirleriyle koordineli bir şekilde çalışırlar. Bu sistemin her bileşeni, feedback mekanizmalarıyla dengelenir (55). Üreme fizyolojisinin temeli olan bu mekanizma, erkeklerde hipotalamus-hipofiz-testis (HHT) aksı olarak bilinmektedir (Şekil 2.9). Bu nedenle HHT aksında meydana gelebilecek herhangi bir bozulma, bazı endokrinolojik bozukluklara, jinekolojik sorunlara hatta infertiliteye neden olabilmektedir (34, 55).

Ergenliğin başlamasından sorumlu olan ve hypothalamus’tan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), adenohipofiz’den FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını uyarır. Adenohipofiz’den salgılanan FSH hormonu, sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezi başlatırken, LH hormonu testisler’deki Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgısını artırır. Testosteron, negatif feedback yoluyla GnRH salgılanmasını baskılayarak LH ve FSH salgısının düzenlenmesini sağlar. Ayrıca testislerde yer alan sertoli hücrelerinden inhibin adı verilen glikoprotein salgılanması gerçekleşir. Spermatogenezi baskılamak gerektiğinde, salgılanan inhibin, ön hipofiz bezi üzerinde güçlü bir inhibitör etki gösterir (Şekil 2.9) (34).



Şekil 2.9. Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı (56)

Hipogonadizm, gl. hypophysialis'ten gonadotropin salgılanmasındaki bir bozukluk nedeniyle ortaya çıkan ve genetik nedeni tam olarak belirlenemeyen bir klinik durumdur. LH ve FSH'nin yetersiz veya eksik salgılanması nedeniyle testis'lerin Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması durur veya azalar. Ayrıca sertoli hücrelerinde de spermatogenez bozulur. Bu hastalıkla dünyaya gelen bireyler ergenlik çağına geldiklerinde sağlıklı bir şekilde ergenliğe giremezler ve ikincil cinsiyet özellikleri gelişmez. İnfertilite bireylerde sık karşılaşılan bir klinik sorundur. Cinsel gelişim bozukluğunun yanı sıra kas-iskelet sistemi bozukluğu, osteoporoz,

anormal vücut yağ dağılımı, anemi, psikiyatrik bozukluklar gibi birçok hastalıkta organ ve sistemleri etkileyen komplikasyonlar görülür (34).

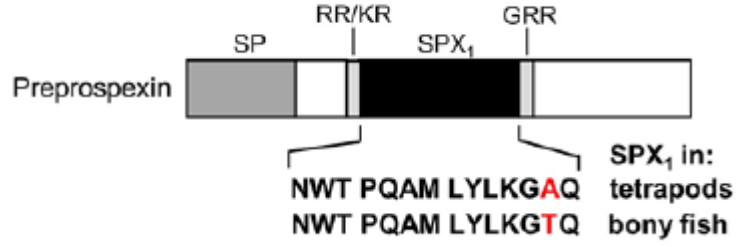
2.9. SPEXİN

Spexin (SPX), 2007 yılında Hidden Markov modeli aracılığıyla keşfedilen endojen bir nöropeptittir. SPX, galanin/kisspeptin/Spexin peptit ailesinin en son keşfedilen üyesidir (33,34).

2.9.1. SPX'in Biyokimyasal Yapısı ve Lokalizasyon

Yeni bir nöropeptit olan SPX, 14 amino asit kalıntısından oluşmaktadır ve nöropeptit Q (NPQ) olarak da bilinmektedir (57). SPX peptidinin amino asit dizisi, tüm omurgalılarda ve omurgasızlarda evrimsel olarak korunmuştur. Bu nedenle SPX'in hayatta kalmak için gerekli olduğu ve birçok vücut fonksiyonunu yerine getirdiği için de çeşitli doku/organlarda bulunabileceği iddia edilmektedir. SPX nöropeptidi kardiyovasküler, iskelet, sindirim, üriner, üreme, endokrin ve merkezi sinir sistemleri dahil olmak üzere vücudun büyük sistemlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca SPX'in, dolaşıma salınarak organların ve dokuların fizyolojik fonksiyonlarını da değiştirebileceği düşünülmektedir (58, 59).

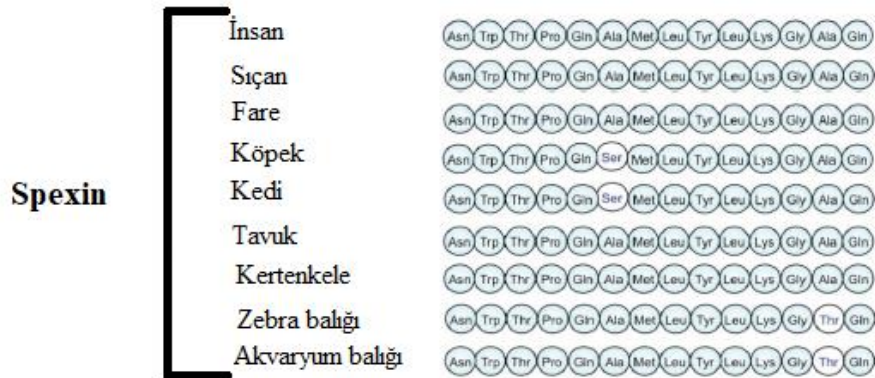
Kromozom 12 üzerinde lokalize olan SPX geni (C12orf39 geni), 116 amino asit kalıntısından oluşan preproSpexin proteinini kodlamaktadır. PreproSpexin peptidi, hem bir hidrofobik sinyal peptidi (SP), hem de iki dibazik prohormon bölünme/amidasyon bölgesi (RR/KR & GRR) içermektedir (60, 61). PreproSpexin, bir dizi protein sentezi sürecinden geçtikten sonra hücresel fizyolojik süreçler için etkili olan "olgun SPX" formu oluşur. (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Tetrapodlarda ve balık modellerinde SPX1 (SPX) kodlama dizisinin organizasyonu (61)

(SP: sinyal peptidi; N: asparagin; W: triptofan; T: treonin; P: prolin; S: glutamin; A: alanin; M: metiyonin; L: lösin; Y: valin; K: lizin; G: glisin; SP: sinyal peptidi; RR/KR ve GRR: bölünme yerleri)

Dibazik bölünme bölgeleri arasındaki küçük bir amino asit bölgesi, nöropeptit Q (NPQ) olarak da adlandırılan SPX'in 14 amino asidini oluşturur. SPX geni (C12orf39), insanlarda 6 ekzon ve 5 introndan oluşmaktadır. 1. ve 2. ekzonlar sinyal peptidini kodlarken, 3. ve 4. ekzonlar aktif peptidi kodlamaktadır. SPX'in 14 amino asitlik dizisi, insanlarda ve diğer türlerde yalnızca küçük değişikliklerle yüksek oranda korunur. Örneğin kedilerde, köpeklerde ve pandalarda, serin amino asit 6. pozisyonda alanin ile değiştirilir (Şekil 2.11) (61).



Şekil 2.11. Çeşitli türlerde SPX'in amino asit dizisi (62)

2.9.2. SPX'in Fizyolojik Fonksiyonları Ve Reseptörleri

SPX'in birçok canlı türünde merkezi/çevresel dokularda yaygın olarak dağılması, birçok fizyolojik ve patolojik fonksiyonda çok önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Örneğin, SPX özellikle gıda alımı ve enerji metabolizmasında (glikoz/yağ metabolizmasını) rol oynarken, ayrıca gastrointestinal motiliteyi, ağrı algısını, endokrin, üreme ve kardiyovasküler fonksiyonları da etkilediği bilinmektedir. Ek olarak, SPX'in temel rolleri obezite, anoreksiya nervoza, diyabet, anksiyete ve depresyon gibi patolojik durumlarda ortaya çıkmıştır (58, 63-65).

SPX'in üreme fonksiyonlarındaki rolü birçok farklı balık türünde yapılan çalışmalarla incelenmiş ve bu türlerde üreme aksını inhibe ettiği gösterilmiştir (65). Liu ve arkadaşları (65), balıkların üreme mevsimlerinde SPX ifadesinin üreme olmayan mevsimlere göre daha düşük seviyelerde olduğunu belirtmişlerdir. İntraperitoneal olarak uygulanan SPX'in japon balıklarında LH salınımını baskıladığını da göstermişlerdir.

SPX'in üreme fonksiyonlarındaki merkezi rolü, öncelikle teleostlarda incelenmiştir ve ortaya çıkan sonuçlar SPX'in hipotalamik-hipofiz-testis aksının hipotalamik ve hipofiz seviyelerinde etki gösterebileceğini düşünülmüştür. Hipotalamik seviyede, turuncu benekli orfoz ve benekli saçılmada, SpxmRNA ifadesi yumurtalık gelişimi boyunca değişmiş, ancak SPX'in in vivo ve in vitro uygulamasının GnRH 1 üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür (59).

Buna karşılık, dil balığına yapılan, intraperitoneal SPX enjeksiyonu, gonadotropin inhibe edici hormon ve GnRH3 mRNA ekspresyonunu arttırmıştır (61, 66). İntraperitoneal olarak uygulanan SPX'in hipotalamusta GnIH ve GnRH ekspresyonunu artırırken, GH ve FSH ifadesini azalttığı belirlenmiştir (67). Gl. hypophysialis düzeyinde, SPX'in gonadotropinler üzerinde inhibitör etkisi olduğu veya hiç etkisi olmadığı gösterilmiştir. SPX'in tilapiada LH ve FSH plazma düzeylerini baskıladığı bildirilmiştir (59, 66).

Birçok farklı türde SPX'in üreme fonksiyonların üzerinde olan endokrin etkileri, hypothalamus ve gl. hypophysialis seviyelerindeki etkileri gösterilmiş olsa da hala insanlarda ve memelilerde bu etkileri net olarak ortaya çıkarabilecek bir çalışma yapılmamıştır.

Yapılan birçok çalışma SPX'in galanin (GAL) peptidine benzer bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymuştur. SPX'in memeli ve memeli olmayan omurgalılarda yaygın olarak eksprese edilen formu SPX1'dir. SPX1'in amino asit dizisindeki 2, 3, 9, 10 ve 12 (Trp2, Thr3, Tyr9, Leu10, Gln12) pozisyonlarındaki amino asitlere, GAL'de karşılık gelen pozisyonlardakiler ile aynıdır. GAL dizisindeki 2, 3 ve 9 pozisyonlarındaki amino asitler (Trp2, Thr3, Tyr9 amino asidine karşılık gelir) GAL reseptörlerine bağlanma ve GAL reseptörlerinin aktivasyonu için ana kriter olduğundan, SPX'in galanin reseptörlerini de bağlayıp aktive edebildiği öne sürülmüştür (68). Memelilerde üç tip GAL reseptörü tanımlanmıştır: GAL1 (1a ve 1b), GAL2 (2a ve 2b) ve GAL3 reseptörleri. Yapılan ligand-reseptör etkileşim çalışmaları, SPX'in (SPX1 ve SPX2) GAL2 ve GAL3 reseptörlerini aktive edebildiğini ancak GAL1 reseptörlerini aktive edemediğini göstermiştir (69, 70). Tüm bu çalışmalar sonucunda SPX'in GAL2 ve GAL3 reseptörleri için endojen bir ligand olduğunun tespit edilmesiyle bu peptidin galanin/kispeptin gen ailesinin bir üyesi olduğu da doğrulanmıştır (58).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Karabük Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.06.2023 tarihli ve 2023/3/6 nolu kararı ile yapılmıştır. Çalışmada yer alan tüm uygulamalar etik kurulun belirttiği protokole uygun olarak, Karabük Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. laboratuvarı ve İnönü Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD. laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEY HAYVANLARI VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmada ortalama 280-320 gr ağırlığında, Wistar Albino cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışma öncesi tüm sıçanlar tartıldı ve vücut ağırlıklarının ortalamaları eşit olacak şekilde dört gruba (n=10) ayrıldı. Çalışma boyunca tüm sıçanlar 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsünde, 21 ± 2 °C sıcaklığındaki ortamda barındırıldı, ad libitum olarak beslendi ve normal musluk suyu verildi.

Grup 1: Kontrol Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı. 7. günün sonunda bu gruptaki sıçanlar dekapite edildi ve kan, hypothalamus ve testis dokuları alındı.

Grup 2: Sham Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca ozmotik mini pompa ile intraserebroventriküler (icv) olarak yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) verildi (10 µl/saat). 7. günün sonunda bu gruptaki sıçanlar dekapite edildi ve kan, hypothalamus ve testis dokuları alındı.

Grup 3: Spexin 30 nmol Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca ozmotik mini pompa ile icv olarak 30 nmol SPX (NovoPro, Çin, Katalog no: 302592) verildi (1µl/saat). 7. günün sonunda bu gruptaki sıçanlar dekapite edildi ve kan, hypothalamus ve testis dokuları alındı.

Grup 4: Spexin 100 nmol Grubu: Bu gruptaki sıçanlara 7 gün boyunca ozmotik mini pompa ile icv olarak 100 nmol SPX verildi (1µl/saat). 7. günün sonunda bu gruptaki sıçanlar dekapite edildi ve kan, hypothalamus ve testis dokuları alındı.

3.2. CERRAHİ İŞLEMLER ÖNCESİ YAPILAN HAZIRLIKLAR

3.2.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

Yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS) SPX peptidinin çözücüsü olarak kullanıldı. yBOS hazırlamak için gereken kimyasallar ve miktarları tablo 3.1’de gösterildi ve 500 ml steril distile su içerisinde karıştırılarak iki farklı çözelti hazırlandı. Elde edilen çözeltilerde 1:1 oranında karıştırıldı ve yBOS elde edildi.

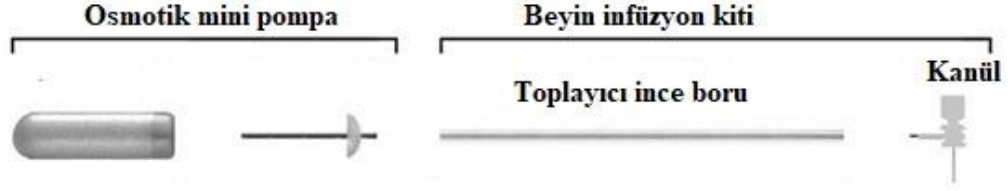
Tablo 3. 1. yBOS hazırlanması için gerekli kimyasallar ve miktarları

Çözelti 1		Çözelti 2	
Kimyasal adı	Miktarı (gr)	Kimyasal adı	Miktarı (gr)
NaCl	8.66	Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	0.214
KCl	0.224	NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0.027
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.206		
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.163		

3.2.2. Beyin İnfüzyon Kitlerinin Ve Ozmotik Mini Pompaların Hazırlanması

Çalışma gruplarındaki sıçanlara SPX ve yBOS infüzyonu yapabilmek için 7 gün boyunca saatte 1 µl madde pompalayabilen ozmotik mini pompalar kullanıldı (Alzet, Katalog no: 2001, ABD) (Şekil 3.1). Sham grubundaki sıçanlara takılacak pompalara yBOS, spexin 30 nmol ve 100 nmol grubundaki sıçanlara takılacak pompalara ise

sırasıyla 30 nmol ve 100 nmol SPX dolduruldu. Pompalara dolun işlemi pompa setine dahil olan küt uçlu iğne ile yapıldı ve metal kanüllü kapak takıldı.



Şekil 3.1. Osmotik mini pompa ve beyin infüzyon kiti (71)

Sıçanların lateral ventrikülleri içerisine madde infüzyonu yapabilmek için pompalara beyin infüzyon kitleri (Alzet, Katalog no: 8663, ABD) bağlandı. İlk olarak beyin infüzyon kit setine dahil olan özel kanüller kitlere takıldı. Takılan kanüller içerisinde hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde infüze edilecek maddeler ile dolduruldu ve osmotik mini pompalara bağlandı (Şekil 3.1).

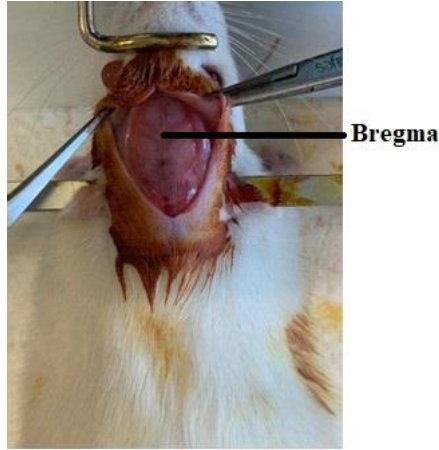
3.2.3. Sıçanların Stereotaksik Cihaza Yerleştirilmesi Ve Beyin İnfüzyon Kitlerinin Takılması

Sıçanlar, intramüsküler olarak 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avusturya) ve 8 mg/kg ksilazin (Alivira, Provet Veteriner Ürünleri, Türkiye) enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Fizyolojik yanıtları ve parmak kısırtma tepkileri değerlendirilerek anesteziye girip girmedikleri belirlendi. Anesteziye girdikleri tespit edilen sıçanların kafa derileri traş edildi ve ağız ve kulaklarından sabitlenerek stereotaksik cihaza (RWD Life Sciences, Standard Stereotaxic for rat, ABD) yerleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Kafa derisi traş edilen sıçanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi

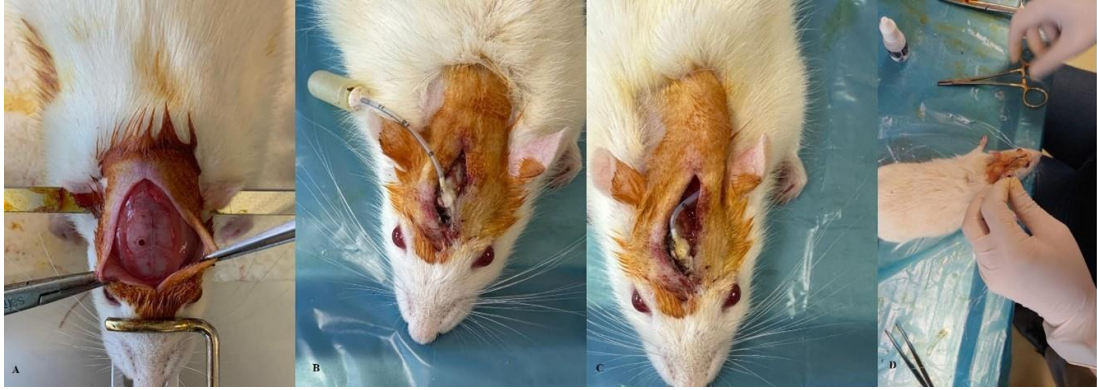
Stereotaksik cihaza yerleştirilen hayvanların kafa derisi %10'luk povidon iyodin ile temizlendi ve vertikal küt bir kesi yapılarak kafa iskeletine ulaşıldı. Kemik yüzeyi iyice temizlenerek bregma noktası belirgin hale getirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.3. Bregma noktası

Lateral ventriküle giriş noktasını belirlemek için bregma noktası referans olarak alındı. Paxinos&Watson sıçan beyin atlasına göre koordinatlar ayarlandı. Bu koordinatlar doğrultusunda, referans noktası olan bregmadan 0.8 mm posterior ve

1.40 mm lateralde ventriculus lateralis'in giriş yeri belirlenip işaretlendi. İşaretlenen nokta, dura mater'e zarar vermeden bir matkap ile dikkatli bir şekilde delindi. Stereotaksik cihaz üzerinde yer alan özel tutucuya beyin infüzyon kiti yerleştirildi ve açılan delikten ventriculus lateralis içerisine indirildi. Beyin infüzyon kiti dış yapıştırıcısı ile kafa iskeletine sabitlendi. Beyin infüzyon kitine bağlı olan ozmotik mini pompalar sıçanların sırt kısmında deri altına yerleştirildikten sonra kesi yeri 2/0 ipek suture ile dikildi ve %10'luk povidon iyodin sürüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3.4. Beyin infüzyon kitinin kafatasına sabitlenmesi ve ozmotik mini pompaların yerleştirilmesi

3.2.4. Sıçanların Dekapite Edilmesi, Kan Ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmanın 7. gününün sonunda sıçanlar anestezi altında dekapite edildi. GnRH seviyesinin sabahın erken saatlerinde en yüksek düzeyde olduğu bilindiği için tüm sıçanların dekapitasyonu aynı gün ve sabah saatlerinde (09:00-11:00) gerçekleştirildi. Sıçanlardan alınan kan örnekleri 4500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri FSH, LH ve testosteron hormon analizlerinin yapılacağı güne kadar -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Alınan hypothalamus dokusu RNA koruyucu solüsyon içeren tüplere koyuldu ve RT-PCR analizleri yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Alınan testis dokuları ise etraf dokulardan temizlendikten sonra histopatolojik analizler için %10'luk formaldehit solüsyonu içerisine alındı.

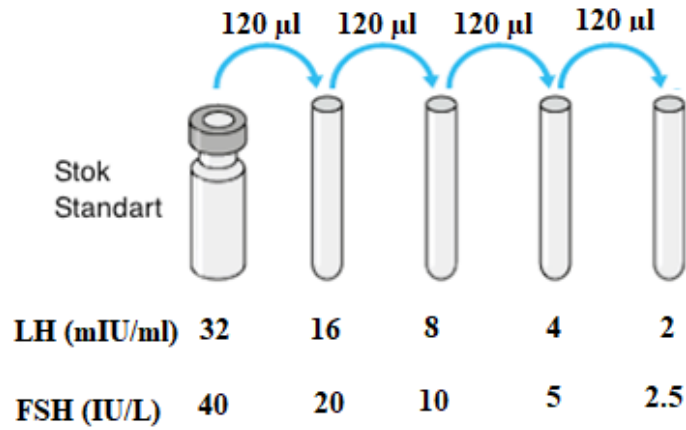
3.3. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

3.3.1. Serum FSH Seviyesinin Belirlenmesi

Serum örneklerinde FSH (SunRed, Katalog no: 201-11-0183) seviyesini belirlemek amacıyla ticari olarak satın alınan rat spesifik ELISA kitleri kullanıldı. Serum FSH seviyesini belirlemek için ilk olarak FSH kiti içerisinde bulunan 80 IU/L konsantrasyonlu standart solüsyon Şekil 3.5'te gösterildiği şekilde standart dilüsyon solüsyonu kullanılarak dilüe edildi (Şekil 3.5). Standart solüsyonu hazırlandıktan sonra serum örnekleri ve kit içerisinde bulunan diğer solüsyonlar da oda sıcaklığına getirildi. Serum FSH seviyesini belirlemek amacıyla kitlerin uygun gördüğü prosedür uygulandı ve basamakları aşağıda özetlendi.

- 100 µl standart solüsyon, kör ve örnekler kuyucuklara eklendi. Kör kuyucuğuna sadece kromojen A, koromojen B ve stop solüsyonu eklenirken FSH-antikor ve Streptavidin HRP eklenmedi. Standart kuyucuklarına 50 µl standart solüsyon ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi. Test kuyucuklarına 40 µl numune, 10 µl FSH-antikor ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi.
- Plakanın üzerine şeffaf etiket ile kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra plaka üzerindeki şeffaf etiket dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Plakadaki sıvı döküldü ve kalan sıvı tamamen uzaklaştırıldı.
- Her kuyucuğa yıkama solüsyonu eklendi ve plaka kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucukların boşaltılması sağlandı. Bu işlem 3 kez olacak şekilde tekrarlandı.
- Her kuyucuğa önce 50 µl kromojen A solüsyonu, hemen ardından da 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C'de karanlık bir ortamda 10 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okuma yapıldı ve değerler kaydedildi.
- Elde edilen OD değerlerinden sonra kitin belirttiği hesaplamaya göre serum FSH seviyeleri hesaplandı.



Şekil 3.5. FSH ve LH ELISA kitlerinin standart solüsyonlarının dilüsyonu

3.3.2. Serum LH Seviyesinin Belirlenmesi

Serum örneklerinde LH (SunRed, Katalog no: 201-11-0180) seviyesini belirlemek amacıyla ticari olarak satın alınan rat spesifik ELISA kitleri kullanıldı. Serum LH seviyesini belirlemek için ilk olarak LH kiti içerisinde çıkan 64 mIU/ml konsantrasyonlu standart solüsyonu şekil 3.5'te gösterildiği şekilde standart dilüsyon solüsyonu kullanılarak dilüe edildi (Şekil 3.5). Standart solüsyonları hazırlandıktan sonra serum örnekleri ve kit içerisinde çıkan diğer solüsyonlar da oda sıcaklığına getirildi. Serum LH seviyelerini belirlemek amacıyla kitin uygun gördüğü prosedür uygulandı ve basamakları aşağıda özetlendi.

- 100 µl standart solüsyon, kör ve örnekler kuyucuklara eklendi. Kör kuyucuğuna sadece kromojen A, koromojen B ve stop solüsyonu eklenirken LH-

antikoru ve Streptavidin HRP eklenmedi. Standard kuyucuklarına 50 µl standart solüsyonu ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi. Test kuyucuklarına 40 µl numune, 10 µl LH-antikoru ve 50 µl Streptavidin HRP eklendi.

- Plakanın üzerine şeffaf etiket ile kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra plaka üzerindeki şeffaf etiket dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Plakadaki sıvı döküldü ve kalan sıvı tamamen uzaklaştırıldı.
- Her kuyucuğa yıkama solüsyonu eklendi ve plaka kağıt havlu üzerine ters çevrilerek kuyucukların boşaltılması sağlandı. Bu işlem 3 kez olacak şekilde tekrarlandı.
- Her kuyucuğa önce 50 µl kromojen A solüsyonu, hemen ardından da 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C'de karanlık bir ortamda 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl reaksiyonu durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okuma yapıldı ve her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değerleri) kaydedildi.
- Elde edilen OD değerlerinden sonra kitin belirttiği hesaplamaya göre serum LH seviyeleri hesaplandı.

3.3.3. Serum Testosteron Seviyesinin Belirlenmesi

Serum testosteron (BT LAB, Katalog no: EA0023Ra) seviyesinin belirlenmesi için ilk olarak ELISA kiti içerisinde bulunan standart, 150 uL konsantrasyonlu standart/numune seyreltici ile sulandırıldı ve 48 ng/ml'lik standart/stok solüsyonu elde edildi. 24ng/mL, 12ng/mL, 6ng/mL, 3ng/mL ve 1,5ng/mL çözeltiler üretmek için standart stok solüsyonu 1:2 oranında seyreltici ile seri olarak seyreltildi. Standart

solüsyonu hazırlandıktan sonra kit içerisinde çıkan diğer çözeltiler ve numuneler de oda sıcaklığına getirildi. Serum testosteron seviyesini belirlemek için kitin önerdiği protokol izlendi ve aşağıda özetlendi.

- Tüm örnekler (10 ul örnek ve 40 ul örnek seyreltici), standart, negatif (50 ul) ve pozitif kontrol (50 ul) kuyucuklara eklendi. Plakanın üzeri şeffaf etiket ile kapatıldı ve iyice karıştırıldı.

- Şeffaf etiket çıkarıldı ve kuyucuklara 300 ul yıkama solüsyonu eklenerek 30 saniye ile 1 dakika kadar kuyucukların yıkanması sağlandı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı. Son yıkamadan sonra plaka kağıt havlu üzerine çevrildi ve kuyucukların kurumaması sağlandı.

- Her kuyucuğa (kör hariç) 50 ul HRP eklendi, etiket ile kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra etiket açıldı ve 2. basamakta anlatılan yıkama işlemi tekrarlandı.

- Her kuyucuğa önce 50 ul substrat solüsyonu A, ardından da substrat solüsyonu B eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

- Daha sonra her kuyucuğa 50 ul durdurma solüsyonu eklendi. Mavi renk hemen sarıya döndü.

- Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 15 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okundu ve her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.

- Elde edilen OD değerlerinden sonra kitin belirttiği hesaplama göre serum testosteron seviyeleri hesaplandı.

3.4. GENETİK ANALİZLER

3.4.1. Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi İle Hypothalamus'taki GnRH mRNA Düzeyinin Belirlenmesi

Deney gruplarındaki sıçanlardan hypothalamus'taki GnRH mRNA düzeyinin belirlenmesi için alınan ve RNA-koruyucu solüsyon içerisinde muhafaza edilen hypothalamus dokuları steril kuru buz üzerinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Bu dokulardan toplam RNA izolasyonu innuPREP RNA mini Kit 2.0 (Analytik Jena, Katalog no: AJ 845-KS-2040050, Almanya) kullanılarak yapıldı. Kitin protokolü aşağıda özetlendi.

- 20 mg doku örneği homojenizasyon için uygun ependorf tüplere konuldu.
- Dokuların üzerine 450 µl lizis solüsyonu RL eklendi ve örneğin homojenleşmesi sağlandı.
- Homojen hale gelen doku örneği 1,5 ml'lik reaksiyon tüplerine alındı ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- Alıcı tüplere döndürme filtresi D yerleştirildi ve santrifüj edilen süpernatant bu filtrenin üzerine aktarıldı. 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatantın tamamının filtreden geçmesi sağlandı.
- Süpernatant filtreden tamamen geçtikten sonra filtre atıldı ve süzüntünün üzerine yaklaşık 400 µl, %70'lik etanol eklendi. Birkaç kez pipetaj yapılarak iyice karışması sağlandı.
- Yeni bir alıcı tüpe döndürme filtresi R yerleştirildi. Etanol eklenen numune döndürme filtresi R üzerine aktarıldı. 11.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Süzüntüyü içeren alıcı tüp atıldı ve döndürme filtresi R yeni bir alıcı tüpe yerleştirildi.

- Döndürme filtresinin kapağı açıldı ve üzerine 500 µl yıkama solüsyonu HS eklendi. Filtrenin kapağı kapatıldıktan sonra 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Döndürme filtresi yeni bir alıcı tüpe yerleştirildi. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu LS eklendi ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Döndürme filtresi elüsyon tüpüne yerleştirildi ve filtrenin kapağı açılarak üzerine 30-80 µl RNaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildikten sonra 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Döndürme filtresi R çıkarılıp atıldı ve tüp içerisinde elde edilen RNA uygun koşullarda muhafaza edildi.

3.4.2. Toplam RNA'ların Saflığının Ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Elde edilen toplam RNA'ların saflıkları ve konsantrasyonları duplike olarak IMPLEN N60 nano volume spektrofotometrede ölçüldü. 260 nm ve 280 nm dalga boyları arasında alınan absorbans değerlerinin oranı (A260/A280) RNA örneklerinin saflık dereceleri hakkında bilgi vermektedir. Bu oranın 1.8-2.0 aralığında olması RNA'ların saflığının en uygun olduğu aralık olarak kabul edilir.

Saflıkları ve konsantrasyonları belirlenen RNA örnekleri, maksimum hassasiyet için cDNA sentez kitinin izin verdiği maksimum konsantrasyon olan 1000 ng'da eşitlendi ve cDNA sentezine kadar -80 °C'de saklandı.

3.4.3 cDNA Sentezi

Toplam RNA örneklerinden cDNA sentezi Euroclone Wonder RT cDNA synthesis kit (Katalog no: EME037050) kullanılarak yapıldı. Kitin protokolü aşağıda özetlenmiştir.

- Kullanmadan önce solüsyonlar vortekslendi ve kısa süre santrifüj edildi.

- Reaksiyon karışımı buz üzerinde ve mikrosantrifüj tüpü içerisinde Tablo 3.2’de verilen miktarlar kullanılarak hazırlandı.

Tablo 3. 2. Reaksiyon karışımı

Bileşenler	Miktar
Total RNA (1000 ng)	X µl (Değişken-1000 ng olacak)
5x Reaction Buffer Mix	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
DNA/RNase Free Water	X µl (Değişken-Son hacim 20 µl olacak)

- Reaksiyon karışımı nazik bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Aşağıdaki program termal döngüleyicide (AnalytikJena qTower 3G, Almanya) kuruldu.
 - o 25°C’de 20 dk (primer bağlanması için)
 - o 48°C’de 15 dk (RNA yapısının highly-structured olma olasılığına karşın protocol uyarınca cDNA sentez sıcaklığı 48°C olarak tercih edildi)
 - o 85°C’de 5 dk (inaktivasyon)
- Elde edilen cDNA örnekleri qRT-PCR analizlerinin yapılacağı zamana kadar -80 °C’de saklandı.

3.4.4. RT-PCR Protokolü

Hypothalamus dokusunda GnRH geninin ekspresyon seviyesini ve β -aktin geninin (kontrol gen, housekeeping) ekspresyon seviyesini analiz etmek için KiCqStart[®] SYBR[®] Green (Sigma, Katalog no: KSPQ12012) primerler ve Euroclone FluoCycle II[™] SYBR[®] Master Mix kullanıldı. Her bir gen için katalogdan seçilmiş ve gen ekspresyonları için optimize edilmiş pre-design primer çiftleri (GnRH primer RefSeq ID: NM_012767; β -aktin primer RefSeq ID: NM_031144) firmadan temin edildi.

RT-PCR analizleri öncesinde primerler için uygun bağlanma sıcaklığının tespit edilmesi ve en iyi amplifikasyonu, en az mismatch ve primer dimerizasyonu ile veren sıcaklığın belirlenmesi için AnalytikJena qTower 3G cihazı kullanılarak gradient bir PCR çalışması yapıldı. Bunun sonucuna göre en uygun sıcaklık 58°C olarak belirlendi.

Tüm reaktifler Tablo 3.3'te verilen oranlarda steril bir tüpe eklendi. Her bir örnek için çalışma iki kez tekrarlandı. RT-PCR şartları kitin önerdiği şekilde ayarlandı; 95 °C'de 5 dk 1 döngü, 95 °C'de 15 sn 35 döngü ve 58 °C'de 15 sn florasan toplama. RT-PCR analizleri sonucunda GnRH ve β -aktin genlerinin mRNA ifadelerindeki değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı.

Tablo 3. 3. RT-PCR analizleri için gereken reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Miktar
FluoCycle IITM SYBR® Master	10 μ l
Forward primer (250 nM)	0.5 μ l
Reverse primer (250 nM)	0.5 μ l
DNA	4 μ l
Steril su	5 μ l
Toplam Reaksiyon hacmi	20 μl

3.5. HİSTOPATOLOJİK ANALİZLER

Deney sonunda alınan testis dokuları %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Tespit sonunda, dokular dehidrasyon ve parlatma işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4-5 μ m kalınlığında alınan kesitler genel morfolojik yapının değerlendirilmesi için hematoksilin-eozin (H&E) boyama metodu ile boyandı.

Leica Q Win görüntü analiz sistemi kullanılarak, her preparattan 20x büyütmede, VIII. aşamada bulunan en az 25 adet semifer tübülün çapı ve epitel kalınlığı ölçüldü.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler, IBM SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 26, SPSS Inc., Chicago, IL) ile yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Histopatolojik ve biyokimyasal analizlerde veriler normal dağılım gösterdiği için değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırmalarında ise varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart hata olarak ifade edildi. Genetik analizlerde veriler normal dağılım göstermediği için değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile değerlendirilirken, çoklu karşılaştırmalarında Conover testi kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde verildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. İcv SPX İNFÜZYONUNUN SERUM LH, FSH VE TESTOSTERON SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİ

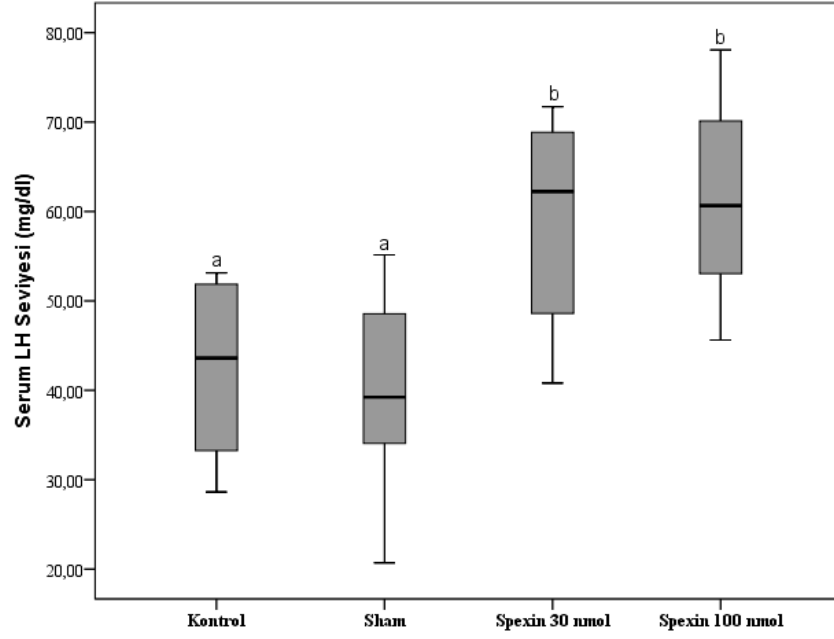
Sıçanlara 7 gün boyunca uygulanan SPX infüzyonu sonrasında serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1. Spexin İnfüzyonun Grupların Serum LH, FSH ve Testosteron Seviyelerine Etkisi

	Kontrol (n=10)	Sham (n=10)	Spexin 30 nmol (n=10)	Spexin 100 nmol (n=10)
LH (mIU/L)	42,5±9,26 ^a	39,89±11,10 ^a	59,18±10,92 ^b	60,67±10,83 ^b
FSH (IU/L)	24,24±8,32 ^a	23,72±6,39 ^a	33,86±8,92 ^b	34,13±7,22 ^b
Testosteron (ng/L)	207,37±13,2 ^a	207,18±14,41 ^a	227,51±8,98 ^b	231,93±8,56 ^b

(Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırılmalarında ise Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel olarak farklılık gösteren gruplar farklı harflerle gösterildi. ^{a,b} p<0.05)

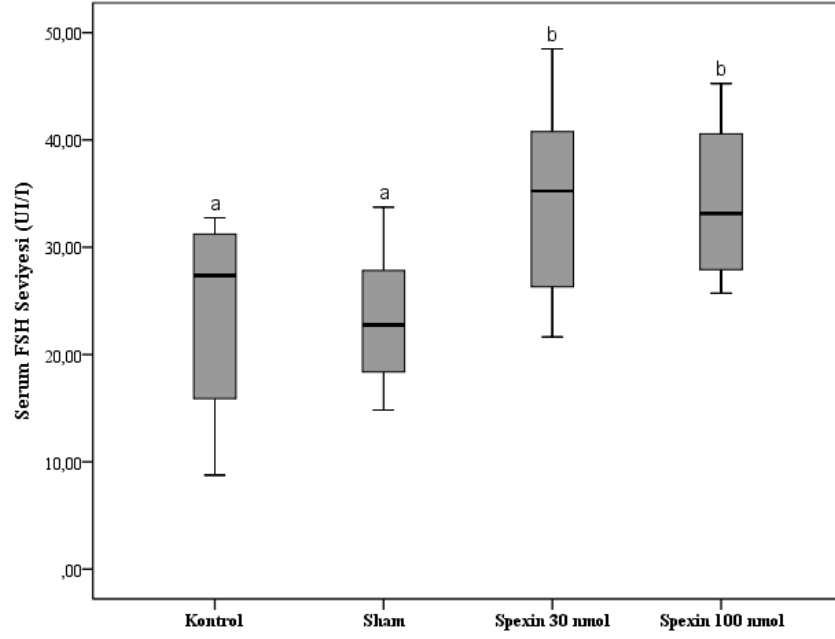
Gruplar arasından serum LH seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken 30 nmol ve 100 nmol SPX uygulanan gruplarda serum LH seviyesinin hem kontrol hem de sham grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü (p<0.05). 30 nmol SPX uygulanan grupta serum LH seviyesinin ise 100 nmol SPX uygulanan grup ile benzer olduğu görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Spexin infüzyonunun grupların serum LH seviyelerine etkisi

(Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırılmalarında ise Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel olarak birbirinden farklı olan gruplar farklı harflerle gösterildi ^{a,b} $p<0.05$)

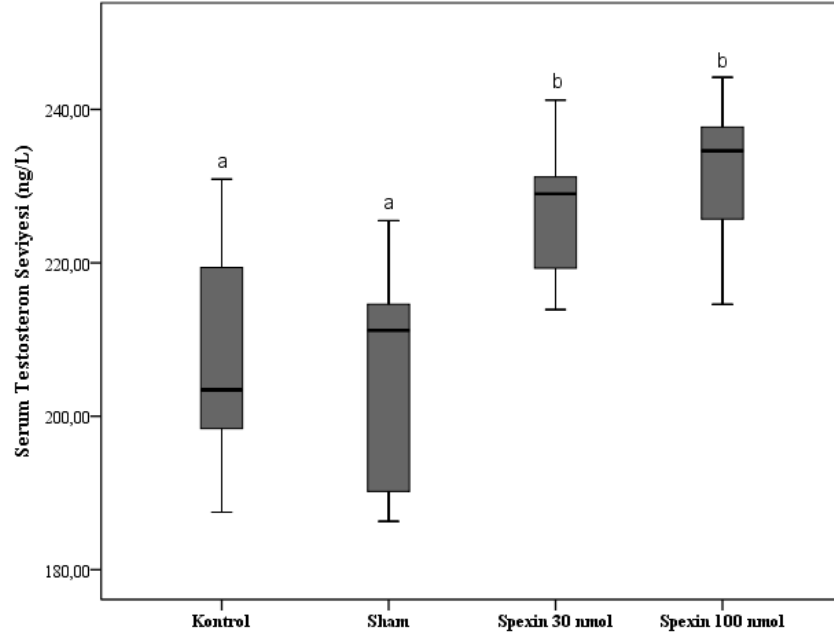
Gruplar arasından serum FSH seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken 30 nmol ve 100 nmol SPX uygulanan gruplarda serum FSH seviyesinin hem kontrol hem de sham grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). 30 nmol SPX uygulanan grupta serum FSH seviyesinin ise 100 nmol SPX uygulanan grup ile benzer olduğu görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Spexin infüzyonunun grupların serum FSH seviyelerine etkisi

(Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırılmalarında ise Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel olarak birbirinden farklı olan gruplar farklı harflerle gösterildi ^{a,b} $p<0.05$)

Serum testosteron seviyeleri açısından kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Buna karşın 30 nmol ve 100 nmol SPX uygulanan gruplarda serum testosteron seviyesinin kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). 30 nmol SPX uygulanan grup ile 100 nmol SPX uygulanan grupta serum testosteron seviyelerinin benzer olduğu görüldü (Şekil 4.3).



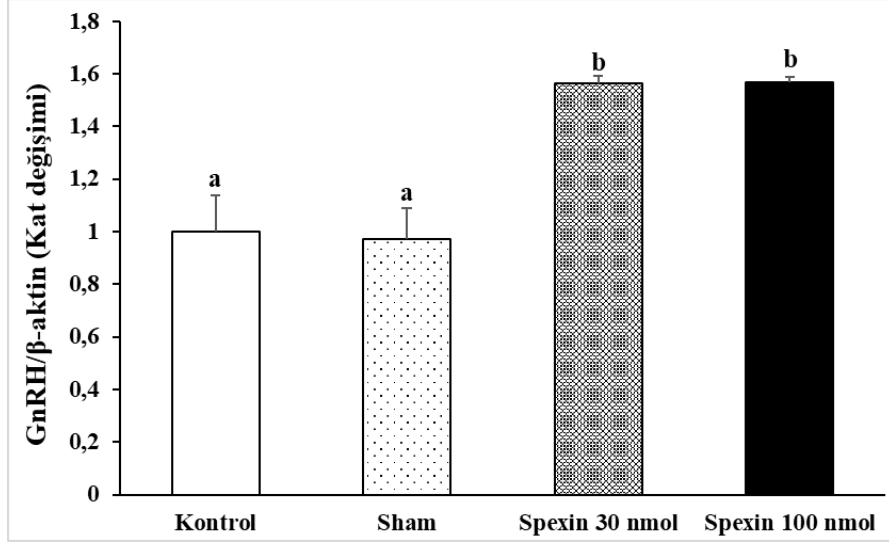
Şekil 4.3. Spexin infüzyonunun grupların serum testosteron seviyelerine etkisi

(Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırılmalarında ise Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel olarak birbirinden farklı olan gruplar farklı harflerle gösterildi ^{a,b} $p<0.05$)

4.2. İcv SPX İNFÜZYONUNUN HYPOTHALAMUS'TA GNRH MRNA SEVİYESİ ÜZERİNE ETKİSİ

İcv olarak uygulanan SPX'in hypothalamus'taki GnRH mRNA seviyesi üzerine yaptığı değişiklikler Şekil 4.4'te gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda kontrol ve sham grupları arasında GnRH mRNA seviyelerinde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Fakat SPX uygulanan gruplarda dozdan bağımsız olarak kontrol ve sham gruplarına göre GnRH mRNA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği görüldü ($p<0.05$).

Yapılan analizler sonucunda 30 nmol SPX verilen grupta GnRH mRNA seviyesinin kontrol grubuna göre 1,56 kat arttığı görülürken 100 nmol SPX verilen grupta ise GnRH mRNA seviyesinin ise kontrole göre 1,57 kat arttığı belirlendi (Şekil 4.4).

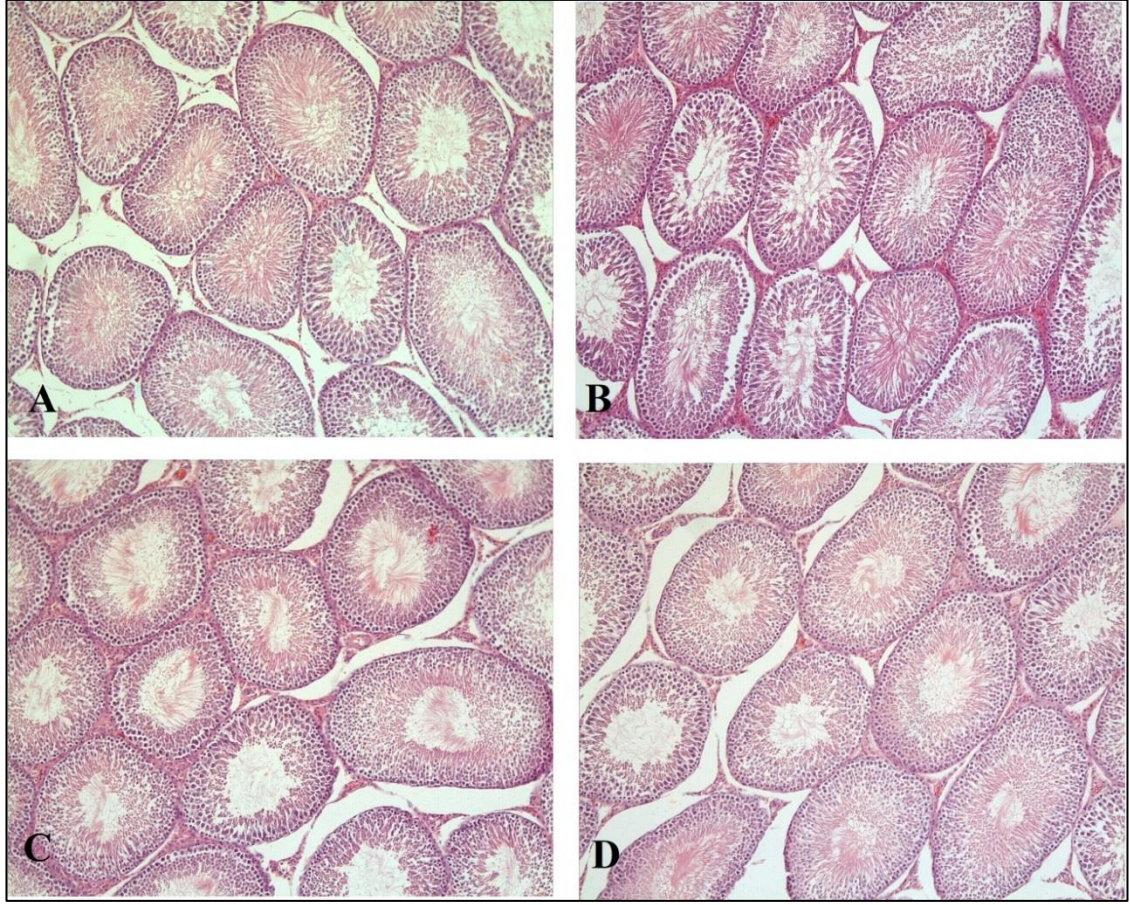


Şekil 4.4. Spexin infüzyonunun hipotalamustaki GnRH gen ifadesi düzeyi üzerine etkisi

(Verilerin değerlendirilmesinde gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile değerlendirilirken, çoklu karşılaştırmalarında Conover testi kullanıldı. Değerler ortalama±SS şeklinde verildi. İstatistiksel olarak birbirinden farklı olan gruplar farklı harfler ile gösterildi. ^{a,b} p<0.05)

4.3. İcv SPX İNFÜZYONUNUN SEMİNİFER TÜBÜL KALINLIĞI VE TÜBÜL ÇAPI ÜZERİNE ETKİSİ

Histolojik incelemeler sonucunda, tüm gruplarda seminifer tübüllerin bazal laminadan lümeneye doğru uzanan normal histolojik görünümde bir epitele sahip olduğu görüldü. Seminifer epitelde sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreler belirgin olarak ayırt edilmekteydi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kontrol (A), sham (B), spexin 30 nmol (C) ve spexin 100 nmol (D) gruplarında seminifer tübüllerin görünümü. (H&E; 10x)

Ortalama seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı, sırasıyla, kontrol grubunda $357.9 \pm 38.9 \mu\text{m}$ ve $74.4 \pm 10.5 \mu\text{m}$; sham grubunda $345.4 \pm 33.4 \mu\text{m}$ ve $75.2 \pm 11.5 \mu\text{m}$; spexin 30 grubunda $376.3 \pm 38.6 \mu\text{m}$ ve $76.9 \pm 11.0 \mu\text{m}$; spexin 100 grubunda $377.9 \pm 37.5 \mu\text{m}$ ve $75.8 \pm 9.4 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.2). Seminifer epitel kalınlığı yönünden tüm gruplar istatistiksel olarak benzer bulundu. Diğer yandan, seminifer tübül çapının Spexin 30 ve spexin 100 gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde arttığı ($p < 0.0001$); sham grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p = 0.001$). Sham grubunda ölçülen tübül çapının spexin 30 ve spexin 100 gruplarına göre de belirgin şekilde düşük olduğu bulundu ($p < 0.0001$).

Tablo 4. 2. Gruplara ait ortalama seminifer epitel kalınlığı ve túbül çapı

Gruplar	Seminifer epitel kalınlığı	Seminifer túbül çapı
Kontrol	74.4 ± 10.5	357.9 ± 38.9
Sham	75.2 ± 11.5	345.4 ± 33.4 ^{b, c}
Spexin 30 nmol	76.9 ± 11.0	376.3 ± 38.6 ^a
Spexin 100 nmol	75.8 ± 9.4	377.9 ± 37.5 ^a

(Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilirken çoklu karşılaştırılmalarında ise Tukey testi kullanıldı. Veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. ^aKontrol grubuna göre artış (p<0.0001), ^bKontrol grubuna göre azalış (p=0.002), ^cSham ve spexin 100 gruplarına göre azalış (p<0.0001))

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

GnRH-gonadotropinler-steroid aksı olarak da adlandırılan hipotalamus-hipofiz-testis aksı, erkeklerde üreme fonksiyonlarının düzenlenmesi için kritik bir öneme sahiptir (72). Erkeklerde spermatogenez süreci hypothalamus, gl. hypophysialis ve testis'leri içeren negatif bir geri beslenme döngüsü aracılığıyla hem gonadotropinlerin hem de androjenlerin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Hypothalamus'ta nuc. arcuatus tarafından sentezlenen GnRH hormonu, adenohipofysis'ten FSH ve LH salınımını uyarır. Testis dokusunda Leydig hücrelerinde seminifer tübüller üzerinde lokal bir etkiye sahip olan LH, sperm üretimini ve olgunlaşmasını sağlayan testosteron üretimini uyarır. Bunun yanında FSH ise etkisini doğrudan sertoli hücreleri üzerine uygulayarak spermatogenezi teşvik eder ve sürdürülmesini sağlar. Testosteronun salınması, adenohipofysis'ten LH salgılanmasını engelleyerek negatif bir geri besleme döngüsü yaratır (73). Oldukça karmaşık olan bu eksende meydana gelebilecek bir bozulma erkeklerde doğrudan ya da dolaylı olarak doğurganlığı etkilemektedir. Bu eksende yer alan hormonların konsantrasyonlarında ya da salgılanmalarında meydana gelebilecek değişikliklerin kısırlığa neden olduğu bilinmektedir (74).

Son yıllarda yapılan çalışmalar Kisspeptin sisteminin GnRH salgılayan nöronların aktivitesini düzenledikleri bildirmektedir. Kisspeptin sisteminin öncüsü olan Kiss1 ve reseptörü olan Kiss1r genlerinde meydana gelen mutasyonların hipogonadotropik hipogonadizm ve erken puberteye neden olduğu gösterilmiştir (75). GAL-Kisspeptin ailesinin bir üyesi olduğu bilinen SPX, ilk olarak sıçanların mide ve özefaguslarında submukozal tabakada keşfedilmiştir. Merkezi olarak plexus corioideus'un ependimal hücrelerinde, superior servikal nöronlarda, ganglion trigeminale'de, retinal fotoreseptörlerde, serebellar purkinje hücrelerinde, hypothalamus'ta nuc. supraopticus ve nuc. paraventricularis'te SPX varlığı immünohistokimyasal

çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun yanı sıra periferik olarak da sıçan epidermisinde, gastrointestinal sistemde, adrenal korteks, medulla, yumurta ve testis gibi endokrin dokularda da SPX varlığından söz edilmektedir (58).

SPX'in birçok canlı türünde hem merkezi hem de periferik dokularda yaygın olarak bulunması fizyolojik olarak da birçok olayda önemli rol oynayabileceğini akla getirmektedir. SPX'in fizyolojik etkileri araştırıldığında özellikle gıda alımı ve enerji metabolizması başta olmak üzere üreme sisteminde, endokrin ve kardiyovasküler sistemlerde önemli roller oynadığı görülmüştür (58).

Gu ve arkadaşları (76) SPX'in insülin direnci ve hepatik glukoz mekanizması üzerindeki etkileri inceledikleri çalışmalarında, 8 haftalık intraperitoneal SPX uygulamasının yüksek yağlı diyetle indüklenmiş sıçanlarda ve insüline dirençli hücrelerde insülin direncini iyileştirdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca SPX'in glukoneogenezi düzenleyerek hepatik steatozu da azalttığı gösterilmiştir. Bu verilere dayanarak SPX'in metabolik hastalıklarda insülin direncini düzenlemede potansiyel bir terapötik fayda sağladığını öne sürmüşlerdir.

Adipokin üretme yetenekleri göz önünü alındığında yağ dokunun önemli bir endokrin organ olduğu kabul edilmektedir. Yağ dokuda bulunan SPX seviyesinin dolaşımdaki SPX seviyesi ile de korelasyon göstermesi glukoz ve lipit metabolizmasında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Egzersizin, obezitenin neden olduğu insülin direncini iyileştirmede oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda obezite ve T2DM'da gönüllü olarak yapılan egzersizin SPX'in ifade seviyesini de önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (77).

İcv olarak uygulanan SPX'in farelerde karanlık fazın ilk döneminde gıda alımını belirgin şekilde azalttığı ortaya konulmuştur (78).

SPX'in endokrin fonksiyonları, beslenme kontrolü ve enerji dengesi üzerindeki etkileri ile lipit ve glikoz homeostazındaki potansiyel rolü ile ilişkili olabilirken, merkezi etkilerinin de hipotalamus-hipofiz aksı aracılığıyla iştah kontrolü ve üreme fonksiyonları için ilgili beyin bölgeleri üzerindeki düzenleyici etkisi ile ilişkili

olabileceği düşünülmektedir (61). Literatürde SPX'in üreme fonksiyonları üzerine etkilerinin incelendiği çok az sayıda çalışma yer almaktadır.

SPX'in üreme sistemi üzerindeki etkileri ilk olarak teleostlarda yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda oldukça karışık sonuçlar elde edilse de SPX'in HHT aksının hypothalamus ve gl. hypophysialis seviyelerinde etki gösterebileceği düşünülmüştür. Turuncu orfoz ve benekli saçaklıda yumurtalık gelişimi boyunca hipotalamik seviyede SPX mRNA seviyesinin değişkenlik gösterdiği görülmüş fakat in vivo koşullarda SPX uygulamasının bir etkisinin olmadığı görülmüştür (79). Bunu aksine yarı düz dil tabanında intraperitoneal SPX enjeksiyonunun GnRH mRNA ifade seviyesini arttırdığı da gösterilmiştir (80, 81). Gl. hypophysialis düzeyinde bakıldığında SPX'in etkileri yine oldukça çelişkilidir. SPX'in gl. hypophysialis düzeyinde gonadotropinler üzerinde ya inhibitor bir etki gösterdiği ya da hiçbir etki göstermediği ifade edilmiştir. Tilapiada'larda SPX'in plazma LH ve FSH seviyelerini baskıladığı bildirilmiştir (66). Aynı şekilde japon balıklarında da dolaşımdaki LH'yı azalttığı gösterilmiştir (81). Bu bulguların aksine turuncu benekli orfozlarda, zebra balıklarında SPX'in üreme fonksiyonları üzerine hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir (81). Teleostlar, memeli muadillerine göre üreme fonksiyonları için tek bir nöropeptit sistemine bağlı olmayan daha karmaşık bir nöroendokrin sisteme sahiptirler. Teleostların bu özellikleri nedeniyle elde edilen bulgular SPX'in memelilerde üreme sistemi üzerine olan rolünü tahmin etmeyi de güçleştirmektedir. Bu nedenle de son zamanlarda memeli canlılar üzerinde SPX'in fizyolojik rollerini aydınlatılması önem kazanmıştır.

Üreme sisteminde en sık karşılaşılan endokrin bozukluklardan biri polikistik over sendromudur (PKOS). Letrozolle indüklenmiş PKOS'lu sıçanlarda, hypothalamus ve overlerde SPX ve SPX reseptörlerinin (GALR2/3) mRNA ifade seviyeleri incelenmiş ve hypothalamus'ta SPX mRNA ifade seviyesinin kontrole göre PKOS'lu sıçanlarda daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna karşın SPX reseptörlerinin ifade seviyesinin ise azaldığı belirtilmiştir. Over dokusunda ise SPX ve SPX reseptörlerinin mRNA seviyeleri PKOS'lu sıçanlarda daha düşük olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar serum SPX seviyelerinde PKOS'lu sıçanlar ile kontrol grubu arasında bir farklılık olmadığı görmüşlerdir (82).

Beyazıt ve arkadaşları (83) obez ve obez olmayan PKOS'lu kadınlar ile sağlıklı kadınların serum SPX seviyelerini karşılaştırdıklarında gruplar arasında serum SPX seviyesi açısından bir fark görememişler ve SPX'in PKOS'ta önemli bir rolü olmadığını belirtmişlerdir.

Sharagard ve Hosseini (84) beş günlük intraperitoneal SPX uygulamasının dişi sıçanlarda serum LH seviyesini azaltırken FSH seviyesini arttırdığını belirtmişlerdir. Artan FSH seviyesinin ovaryumun çok katlı ve antral foliküllerini artırırken azalan LH seviyesine bağlı olarak serum progesteron seviyesini düşürdüğünü ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada, SPX'in sıçanlarda üreme fonksiyonları üzerine etkileri detaylı bir şekilde incelenmeye çalışılmıştır. Literatürdeki az sayıda çalışmanın aksine, bu çalışmada merkezi olarak uygulanan SPX'in erkek sıçanlarda üreme sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Farklı dozlarda (30 nmol ve 100 nmol) uygulanan SPX'in hypothalamus'ta GnRH mRNA seviyesini dozdan bağımsız olarak artırdığı görülmüştür. 7 gün boyunca özel geliştirilmiş pompalar aracılığıyla ventriculus lateralis'e infüze edilen SPX'in, hypothalamus'ta GnRH geninin üzerindeki aktive edici etkisi ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra SPX infüzyonunun, GnRH üzerindeki aktive edici etkisine bağlı olarak gl. hypophysialis'ten salgılan LH ve FSH hormonları ile testis dokusundan salgılanan testosteron hormon seviyesini de arttırdığı görülmüştür. Artan GnRH ifadesi adenohipofiz'i uyararak buradan salgılan LH ve FSH hormonlarının salgılanmasında da artış meydana getirmektedir.

Yapılan literatür taramalarında SPX'in testis dokusunda seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığına etkileri üzerinde durulmadığı görülmüştür. Bu çalışma merkezi olarak uygulanan SPX'in seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı üzerine olan etkilerini inceleyen ilk çalışma olması açısından da önemlidir. Seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığında meydana gelebilecek olası değişikliklerin artan LH, FSH ve testosteron seviyesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız sonucunda artan LH, FSH ve testoseron seviyelerinin seminifer epitel kalınlığında bir değişikliğe neden olmadığı belirlenirken SPX uygulanan gruplarda tübül çapının belirgin derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. Seminifer tübül çapı ve epitel

kalınlığında meydana gelebilecek değişiklikler hormonal faktörlerden etkilenebildiği gibi çevresel faktörlerden de etkilenebilmektedir.

Elde edilen tüm bu verilere dayanarak çalışmamızın SPX'in HHT aksını etkileyerek üreme fonksiyonlarını düzenlemedeki rolünü en detaylı şekilde inceleyen çalışma olduğu görölmektedir ve SPX'in memelilerde de üreme fonksiyonları üzerinde önemli roller oynayabileceğini akla getirmektedir. Fakat SPX'in memelilerde üreme fonksiyonlarını net bir şekilde ortaya koyabilmek için çok daha fazla sayıda çalışmaya gerek duyulmaktadır.

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda merkezi olarak uygulanan SPX'in GnRH ifade seviyesini, serum FSH, LH ve testosteron seviyelerini arttırmış olması SPX'in üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Literatürde, SPX'in üreme fonksiyonları üzerine etkilerini inceleyen en kapsamlı çalışma olması açısından sonuçlarımız önem arz etmektedir. Fakat üreme davranışları üzerine SPX'in fonksiyonlarının daha detaylı bir şekilde araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Her ne kadar SPX infüzyonunun testis dokusunda seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığında meydana getirdiği morfolojik değişiklikler ortaya konulmuş olsa da infertilite için asıl önemli olan sperm sayısı, spermelerin morfolojik özellikleri ve sperm hareketliliği üzerindeki etkilerinin de ortaya konulması gerekmektedir. Testis dokusunda immünohistokimyasal analizler ile sertoli ve leydig hücre sayılarının belirlenmesi de SPX'in üreme fonksiyonlarındaki rolünün belirlenmesinde etkili olacaktır. Tüm bu sonuçlar ele alındığında, SPX'in hem dişilerde hem de erkeklerde üreme davranışları üzerine olan etkilerini aydınlatabilmek için daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Özdemir E, Kaplan S. İnfertilite ve Hemşirelik Yaklaşımı. Türkiye Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi.4(1):79-89.
2. Yılmaz F. Sperm değerlendirme testleri: dünden bugüne. Journal of Health Sciences and Medicine. 2020;3(1):71-6.
3. Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD. Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a meeting on medical, ethical and social aspects of assisted reproduction, held at WHO Headquarters in Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002.
4. Dourou P, Gourounti K, Lykeridou A, Gaitanou K, Petrogiannis N, Sarantaki A. Quality of Life among Couples with a Fertility Related Diagnosis. Clinics and Practice. 2023;13(1):251-63.
5. Woodward B, Tomlinson M, Kirkman-Brown J. Replacing IUI with IVF for initial treatment of unexplained infertility: why this NICE recommendation is cause for concern. Human Fertility. 2016;19(2):80-4.
6. Türkyılmaz S, Çavlin A. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması. Ulusal Toplantı Ankara. 2013;2014:56-8.
7. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. Reproductive biomedicine online. 2001;2(1):173-85.
8. Shpakov AO, Ryzhov JR, Bakhtyukov AA, Derkach KV. The regulation of the male hypothalamic-pituitary-gonadal axis and testosterone production by adipokines. Advances in testosterone action: IntechOpen; 2018. p. 25-57.
9. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, et al. Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi. Kendirci M, Miroğlu C Varikosel patofizyolojisi İstanbul: Türk Androloji Derneği Yayınları. 2004:427-46.
10. Yardımcı IA, Keleştimur H. Puberte nöroendokrinolojisi ve gonadotropin salgılatıcı hormon nöronları. Nobel Medicus Journal. 2019;15(2).
11. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. Metabolism. 2018;86:3-17.
12. Mirabeau O, Perlas E, Severini C, Audero E, Gascuel O, Possenti R, et al. Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. Genome research. 2007;17(3):320-7.

13. Gu L, Ma Y, Gu M, Zhang Y, Yan S, Li N, et al. Spexin peptide is expressed in human endocrine and epithelial tissues and reduced after glucose load in type 2 diabetes. *Peptides*. 2015;71:232-9.
14. Li S, Liu Q, Xiao L, Chen H, Li G, Zhang Y, et al. Molecular cloning and functional characterization of spexin in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2016;196:85-91.
15. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi: kemikler, eklemler, kaslar, iç organlar: Güneş Tıp Kitabevleri*; 2014. 330-2 p.
16. 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.
17. Moore KL, Dalley AF. *Clinically oriented anatomy: Wolters kluwer india Pvt Ltd*; 2018. 266-7 p.
18. Netter FH. *Atlas of human anatomy, Professional Edition E-Book: including NetterReference.com Access with full downloadable image Bank: Elsevier health sciences*; 2014.
19. LE W. *Snell's Clinical anatomy by regions. Head and Neck 10th ed Philadelphia: Walters Kluwer*. 2019:1713-6.
20. Sobotta J. *Sobotta: atlas de anatomía humana: Ed. Médica Panamericana*; 2006.
21. Pathak D, Kapoor K, Gupta MK. Testicular stem cell niche. *Stem Cells in Veterinary Science: Springer*; 2022. p. 161-82.
22. Fujisawa M. Regulation of testicular function by cell- to- cell interaction. *Reproductive medicine and biology*. 2006;5(1):9-17.
23. Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of reproduction*. 1973;9(5):500-32.
24. Russell LD, Peterson R. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *International review of cytology*. 1985;94:177-211.
25. Ahmed EA, de Rooij DG. Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Meiosis: Volume 2, Cytological Methods*. 2009:263-77.
26. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology*. 2012;9(6):330-8.

27. Chang C, Chen Y-T, Yeh S-D, Xu Q, Wang R-S, Guillou F, et al. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(18):6876-81.
28. McLachlan RI, O'DONNELL L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, PRATIS K, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *Journal of andrology*. 2002;23(2):149-62.
29. Reis MM, Moreira AC, Sousa M, Mathur PP, Oliveira PF, Alves MG. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. *Journal of Applied Toxicology*. 2015;35(8):870-83.
30. Fijak M, Meinhardt A. The testis in immune privilege. *Immunological reviews*. 2006;213(1):66-81.
31. Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis*. 2011;1(2):116-20.
32. DePaolo LV. Inhibins, activins, and follistatins: the saga continues. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1997;214(4):328-39.
33. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:10-26.
34. Barrett KE. Ganong's review of medical physiology. *Endocrine & Reproductive Physiology*. 2019:402.
35. Meinhardt A, Bacher M, McFarlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, et al. Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology*. 1996;137(11):5090-5.
36. Kraemer WJ, Loebel CC, Volek JS, Ratamess NA, Newton RU, Wickham RB, et al. The effect of heavy resistance exercise on the circadian rhythm of salivary testosterone in men. *European journal of applied physiology*. 2001;84:13-8.
37. Bremner WJ, Vitiello MV, Prinz PN. Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1983;56(6):1278-81.
38. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(2):589-98.

39. Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview. In: Zini A, Agarwal A, editors. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. New York, NY: Springer New York; 2011. p. 19-44.
40. de 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.
41. Nishimura H, L'Hernault SW. Spermatogenesis. *Current Biology*. 2017;27(18):R988-R94.
42. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl*. 2008;29(5):469-87.
43. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "spermatogenesis". *Encyclopedia Britannica*, 4 Apr. 2023, <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>. Accessed 13 April 2023.
44. Guo J, Zhao Y, Huang W, Hu W, Gu J, Chen C, et al. Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(10):3550-5.
45. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
46. Wei F, Long A, Wang Y. The Asprosin-OLFR734 hormonal signaling axis modulates male fertility. *Cell Discov*. 2019;5:55.
47. Lechan RM, Toni R. Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc. Copyright © 2000-2023, MDTText.com, Inc.; 2000.
48. Arifoğlu Y. Her Yönüyle Nöroanatomi. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2022. 210-4 p.
49. Caqueret A, Boucher F, Michaud JL. Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Developmental biology*. 2006;298(1):95-106.
50. Szarek E, Cheah P-S, Schwartz J, Thomas P. Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;323(1):115-23.
51. Moenter SM, DeFazio AR, Pitts GR, Nunemaker CS. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol*. 2003;24(2):79-93.

52. Urbanski HF, Ojeda SR. Activation of luteinizing hormone-releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology*. 1987;46(3):273-6.
53. Ni Y, Zhou Y, Lu L, Grossmann R, Zhao R. Developmental changes of FSH-R, LH-R, ER-beta and GnRH-I expression in the ovary of prepubertal ducks (*Anas platyrhynchos*). *Anim Reprod Sci*. 2007;100(3-4):318-28.
54. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi: Dolaşım Sistemi, Periferik ve Merkezi Sinir Sistemi, Duyu Organları: Güneş Tıp Kitabevleri*; 2014. 296,352 p.
55. Krsmanovic LZ, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ. The hypothalamic GnRH pulse generator: multiple regulatory mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(8):402-8.
56. <https://basicmedicalkey.com/biology-of-obesity/>. 30.05.2023
57. Li S, Liu Q, Xiao L, Chen H, Li G, Zhang Y, et al. Molecular cloning and functional characterization of spexin in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2016;196-197:85-91.
58. Darakci Ö, Bozkurt A. Structure and functions of spexin as a new neuroendocrine signal. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2022;39(3):893-900.
59. Tran A, He W, Chen JT, Belsham DD. Spexin: Its role, regulation, and therapeutic potential in the hypothalamus. *Pharmacology & therapeutics*. 2022;233:108033.
60. Wan B, Wang X-R, Zhou Y-B, Zhang X, Huo K, Han Z-G. C12ORF39, a novel secreted protein with a typical amidation processing signal. *Bioscience reports*. 2010;30(1):1-10.
61. Ma A, Bai J, He M, Wong AO. Spexin as a neuroendocrine signal with emerging functions. *General and comparative endocrinology*. 2018;265:90-6.
62. Lv SY, Zhou YC, Zhang XM, Chen WD, Wang YD. Emerging Roles of NPQ/Spexin in Physiology and Pathology. *Front Pharmacol*. 2019;10:457.
63. Wong MK, Sze KH, Chen T, Cho CK, Law HC, Chu IK, et al. Goldfish spexin: solution structure and novel function as a satiety factor in feeding control. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;305(3):E348-E66.
64. Tian Z, Xu S, Wang M, Li Y, Chen H, Tang N, et al. Identification, tissue distribution, periprandial expression, and anorexigenic effect of spexin in Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. *Fish Physiol Biochem*. 2020;46(6):2073-84.

65. Liu Y, Li S, Qi X, Zhou W, Liu X, Lin H, et al. A novel neuropeptide in suppressing luteinizing hormone release in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;374(1-2):65-72.
66. Cohen Y, Hausken K, Bonfil Y, Gutnick M, Levavi-Sivan B. Spexin and a Novel Cichlid-Specific Spexin Paralog Both Inhibit FSH and LH Through a Specific Galanin Receptor (Galr2b) in Tilapia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:71.
67. Wang S, Wang B, Chen S. Spexin in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*): molecular cloning, expression profiles, and physiological effects. *Fish Physiol Biochem*. 2018;44(3):829-39.
68. Kim DK, Yun S, Son GH, Hwang JI, Park CR, Kim JI, et al. Coevolution of the spexin/galanin/kisspeptin family: Spexin activates galanin receptor type II and III. *Endocrinology*. 2014;155(5):1864-73.
69. Wang S, Hashemi T, Fried S, Clemmons AL, Hawes BE. Differential intracellular signaling of the GalR1 and GalR2 galanin receptor subtypes. *Biochemistry*. 1998;37(19):6711-7.
70. Branchek TA, Smith KE, Gerald C, Walker MW. Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(3):109-17.
71. Hagg T. Intracerebral infusion of neurotrophic factors. *Methods Mol Biol*. 2007;399:167-80.
72. Singh V, Agrawal NK, Verma R, Singh K. HPG axis: The central regulator of spermatogenesis and male fertility. *Male infertility: Understanding, causes and treatment*. 2017:25-36.
73. Akingbemi BT. Estrogen regulation of testicular function. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:51.
74. Medicine PCotASfR. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*. 2008;90(5):S60.
75. Mele E, D'Auria R, Scafuro M, Marino M, Fasano S, Viggiano A, et al. Differential Expression of Kisspeptin System and Kisspeptin Receptor Trafficking during Spermatozoa Transit in the Epididymis. *Genes (Basel)*. 2022;13(2).
76. Gu L, Ding X, Wang Y, Gu M, Zhang J, Yan S, et al. Spexin alleviates insulin resistance and inhibits hepatic gluconeogenesis via the FoxO1/PGC-1alpha pathway in high-fat-diet-induced rats and insulin resistant cells. *Int J Biol Sci*. 2019;15(13):2815-29.
77. Fang P, Ge R, She Y, Zhao J, Yan J, Yu X, et al. Adipose tissue spexin in physical exercise and age-associated diseases. *Ageing Res Rev*. 2022;73:101509.

78. Wong MKH, Chen Y, He M, Lin C, Bian Z, Wong AOL. Mouse Spexin: (II) Functional Role as a Satiety Factor inhibiting Food Intake by Regulatory Actions Within the Hypothalamus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:681647.
79. Deng SP, Chen HP, Zhai Y, Jia LY, Liu JY, Wang M, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of spexin in spotted scat (*Scatophagus argus*). *Gen Comp Endocrinol*. 2018;266:60-6.
80. Wang L, Tran A, Lee J, Belsham DD. Palmitate differentially regulates Spexin, and its receptors Galr2 and Galr3, in GnRH neurons through mechanisms involving PKC, MAPKs, and TLR4. *Mol Cell Endocrinol*. 2020;518:110991.
81. Tran A, He W, Chen JTC, Belsham DD. Spexin: Its role, regulation, and therapeutic potential in the hypothalamus. *Pharmacol Ther*. 2022;233:108033.
82. Respekta N, Maslanka A, Mlyczynska E, Billert M, Szlaga A, Sambak P, et al. Levels of spexin and its receptors GALR2 and GALR3 in the hypothalamus and ovary of letrozole-induced polycystic ovary syndrome in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;627:207-13.
83. Beyazit F, Hiz MM, Turkon H, Unsal MA. Serum spexin, adiponectin and leptin levels in polycystic ovarian syndrome in association with FTO gene polymorphism. *Ginekol Pol*. 2021;92(10):682-8.
84. Saharagard A, Hosseini SE. Effect of spexin neuropeptide on the function of the pituitary-gonadal axis and ovarian follicles in mature female rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 2017;7(3):390-7.

EK AÇIKLAMALAR A.

ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
KARABÜK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-55212866-050.99-202271
Konu : Etik Kurul İzni Hakkında.

02.01.2023

Sayın Dr. Öğr.Üyesi Nesibe YILMAZ

Karabük Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kuruluna proje yöneticisi olarak sunmuş olduğunuz "**İntraserebroventriküler Spexin İnfüzyonunun Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı Üzerine Etkileri**" başlıklı Yüksek Lisans projeniz 27.12.2022 tarih ve 2022/10 karar numarası ile yapılan etik kurul toplantısında amaç, gerekçe ve uygulamayla ilgili olarak Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre incelenmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu: BS564AZI47

Belge Doğrulama Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4043&eD=BS564AZI47&eS=202271>

Adres: Karabük Üniversitesi Demir Çelik Kampüsü Merkez/Karabük

Telefon: 444 0478

e-Posta: iletisim@karabuk.edu.tr

İnternet Adresi: <http://www.karabuk.edu.tr>

Kep Adresi: karabukuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Beyza Nur KALAYCI

Unvanı: Büro Personeli



ÖZGEÇMİŞ

Rida Zahiraldin İbrahim YASİN, Hartum Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2020 yılında mezun oldu. 2021 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.