

**SIÇANLARDA İNTRASEREBROVENTRİKÜLER
SALUSİN- β İNFÜZYONUN HİPOTALAMUS-
HİPOFİZ-TESTİKÜLER AKS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

İLKER DEMİR

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışman

Doç. Dr. Suat TEKİN

Yüksek Lisans Tezi -2019

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA İNTRASEREBROVENTRİKÜLER SALUSİN- β İNFÜZYONUN
HİPOTALAMUS- HİPOFİZ- TESTİKÜLER AKS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

İlker DEMİR

Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışman
Doç. Dr. Suat TEKİN

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSG-2017-952 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA


2019

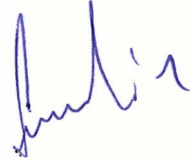
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **İlker DEMİR'in** “**Sıçanlarda İntraserebroventriküler Salusin- β İnfüzyonun Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks Üzerindeki Etkileri**” konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/04/2019


Prof. Dr. Süleyman SANDAL
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Sinan CANPOLAT
Fırat Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Suat TEKİN
Tez Danışmanı
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİN.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Salusinler	3
2.1.1. Tarihçesi & Sınıflandırılması.....	3
2.1.2. Sal- α	3
2.1.2.1. Biyokimyasal Yapısı.....	3
2.1.2.2. Sal- α Salgılanması ve Dokulardaki Lokalizasyonu	4
2.1.2.3. Sal- α 'nın Fizyolojik Rollerini.....	4
2.1.2.3.1. Kardiyovasküler Sistem ile İlişkisi	4
2.1.2.3.2. Boşaltım Sistemi ile İlişkisi	5
2.1.2.3.3. Sinir Sistemi ile İlişkisi.....	6
2.1.2.3.4. Diyabetes Mellitus ile İlişkisi	6
2.1.2.3.5. Metabolik Sendrom ile İlişkisi.....	6
2.1.3. Sal- β	7
2.1.3.1. Biyokimyasal Yapısı.....	7
2.1.3.2. Salusin- β Salgılanması ve Dokulardaki Lokalizasyonu	9
2.1.3.3. Salusin- β 'nin Fizyolojik Rollerini	9
2.1.3.3.1. Kardiyovasküler Sistem ile İlişkisi	9
2.1.3.3.2. Gastrointestinal Sistem ile İlişkisi	10
2.1.3.3.3. Diyabetes Mellitus ile İlişkisi	10
2.1.3.3.4. Üreme Sistemi ile İlişkisi.....	10
2.1.3.3.5. Boşaltım Sistemi ile İlişkisi	11
2.1.3.3.6. Merkezi Sinir Sistemi ile İlişkisi	11
2.2. Hipotalamus	11
2.2.1. Hipotalamik Nükleuslar	12

2.2.2. Hipotalamusta Salgılanan Hormonlar ve Fonksiyonları.....	14
2.3. Hipofiz	15
2.3.1. Hipofiz Bezi Anatomisi	15
2.4. Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks Bileşenleri	17
2.4.1. GnRH'nin Hipotalamasutan Salgılanması	17
2.4.2. Hipofiz Bezinden FSH ve LH Salgılanması	18
2.5. Testislerin Yapısı ve Fonksiyonları	18
2.5.1. Testis Anatomisi	18
2.5.2. Testis Histolojisi	19
2.5.2.1. Seminifer Tübül Epitel.....	20
2.5.2.2. Sertoli Hücreleri.....	21
2.5.2.2.1. Sertoli Hücrelerinin Sperm Yapımındaki Fizyolojik Rolü.....	21
2.5.2.3. Leydig Hücreleri	22
2.6. Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks'ın Düzenlenmesi	23
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Deney Hayvanlarının Gruplara Ataması.....	24
3.2. Gruplarının Oluşturulması	24
3.3. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi.....	25
3.4. Hazırlık	25
3.4.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması	25
3.4.2. Ozmotik Pompaların ve Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması.....	26
3.4.3. Deneye Başlanması.....	27
3.4.3.1. Sıçanlarda icv infüzyonun gerçekleştirilmesi	27
3.4.3.2. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması.....	32
3.5. Analizlerin Yapılması	33
3.5.1. RT-PCR Analizleri	33
3.5.2. Hormon ve Biyokimyasal Parametrelerin Tayini	34
3.5.2.1. Serum LH ve FSH Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	34
3.5.2.2. Serum Testosteron Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	36
3.5.3. Testis Histolojisi	37
3.5.4. İstatiksel Analiz	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. İcv Salusin- β İnfüzyonunun GnRH mRNA Seviyesi Üzerindeki Etkileri	38
4.2. İcv Salusin- β İnfüzyonunun Serum LH Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	38

4.3. İcv Salusin- β İnfüzyonunun Serum FSH Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	39
4.4. İcv Salusin- β İnfüzyonunun Serum Testosteron Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	40
4.5. Histolojik İnceleme.....	41
4.5.1. İcv Salusin- β Uygulamasının Seminifer Tübül Yapısı ve Çapı Üzerindeki Etkileri.....	41
4.5.2. İcv Salusin- β Uygulamasının Germinal Epitel Kalınlığı Üzerindeki Etkileri	44
5. TARTIŞMA	46
5.1. Sal- β 'nin Serum LH, FSH, Testosteron Seviyeleri ile Semnifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığı Üzerine Etkileri.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	50
EKLER.....	60
EK 1. Özgeçmiş	60
EK 2. Etik Kurulu	61

TEŞEKKÜR

TSG-2017-952 numaralı yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Yüksek lisans eğitimim süresince deneyimleriyle bana ışık tutan, tez araştırmamın her aşamasına destek veren, sevgi ve saygı duyduğum danışman hocam Doç. Dr. Suat TEKİN başta olmak üzere akademik eğitime adım attığım ilk günden itibaren bana emek veren, desteklerini hissettiğim İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalındaki hocalarıma, tez araştırmanın histolojik analizlerinin yapımında destek ve katkısını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Nigar VARDI' ya,

Nefes aldığım günden bu güne her zaman yanımda olan aileme, yüksek lisans eğitimim boyunca verdiği destek ve gösterdiği anlayıştan dolayı sevgili eşim Dr. Bilsev DEMİR ve varlığıyla bana güç veren yaptığım işleri daha anlamlı kılan oğlum Yılmaz Demirhan DEMİR'e,

Sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Sıçanlarda İntraserebroventriküler Salusin- β İnfüzyonunun Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks Üzerindeki Etkileri

Amaç: Preprosalusin'den köken alan salusin- β (Sal- β), biyoaktif peptit yapılı ve çok fonksiyonlu bir hormondur. Bu peptitin hipotalamusta varlığı bilinirken, hipotalamusun oluşturduğu salgılar ile açığa çıkan hipotalamik cevaplar neticesinde hipofiz bezini etkilediği de bilinmektedir. Bu çalışma Sal- β 'nin erkek üreme sistemi üzerindeki endokrinolojik etkilerini açıklayabilmek amacıyla yapıldı.

Materyal Metot: Çalışmada *Wistar Albino* cinsi 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar vücut ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrıldı (n=10). Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Uygulama gruplarına ise intraserebroventriküler (icv) olarak 7 gün boyunca yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS), 2 ve 20 nmol/kg/240 μ l/gün salusin- β infüzyonu yapıldı. 7 gün sonra hayvanlar dekapite edilerek kan ve testis doku örnekleri toplandı. Toplanan kanlar serumlarına ayrılarak testosteron, LH ve FSH seviyeleri Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Toplanan hipotalamus dokularından reverse transcription-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak grupların GnRH mRNA seviyeleri belirlendi. Toplanan testis dokularından ise hemotoksilen-eozin boyama metodu kullanılarak seminifer tübül ve germinal epitel yapıları incelendi.

Bulgular: Uygulanan Sal- β 'nin her iki konsantrasyonun da (2 ve 20 nmol) serum LH ve FSH seviyesini kontrol ve sham gruplarına kıyasla arttırdığı belirlendi (p<0.05). Serum testosteron seviyesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında 2 ve 20 nmol Sal- β infüzyonu yapılan sıçanların, kontrol ve sham gruplarındaki sıçanlara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05). Yine gruplar GnRH mRNA seviyesi açısından değerlendirildiğinde Sal- β infüzyonunun GnRH mRNA seviyesini arttırdığı görüldü (p<0.05). Yapılan histolojik analizler sonunda 2 ve 20 nmol Sal- β infüzyonu yapılan sıçanların testis dokularında germinal epitel çapı ve seminifer tübül çaplarının (2 nmol Sal- β uygulanan grup hariç) azaldığı tespit edilmiştir (p<0.05).

Sonuç: Çalışma sonunda elde edilen veriler Sal- β 'nin sıçanlarda serum testosteron, LH ve FSH seviyelerini arttırdığı öte yandan germinal epitel kalınlığı ve seminifer tübül çapında azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Bu bulgular Sal- β 'nin hipotalamus-hipofiz-testiküler eksen üzerinde önemli roller üstlenebileceğinin ilk sinyallerini vermektedir.

Anahtar kelimeler: Salusin- β , Hipotalamus, Hipofiz, Testis, GnRH

ABSTRACT

The Effects of Intracerebroventricularly Administered Salusin- β on Hypothalamus- Hypophysis- Testiküler Axes in Rats

Aim: Salusin- β (Sal- β) is a hormone which originates from preprosalusin, bioactive peptide - structured and multifunctional. It is known that this peptide causes pressure on the hypothalamus neurone and posterior hypophysis by systematic circulation and the existence of this peptide in hypothalamus and the effects of hypothalamic responses, which occur via hypothalamus secretion on hypophysis is known. This research has been made to show the effects of Sal- β on men's Reproductive System.

Material and Method: On the research, 40 Wistar Albino rats were used. Those animals were divided into 4 groups in a way that their body weights are closed to each other (n=10). Nothing was applied to the control group. To experiment group, for seven days long, artificial cerebrospinal fluid (CSF), 2 and 20 nmol/kg/240 μ l/days infusion of salusin β was applied in intracerebroventricular (ICV) way. After seven days, animals were decapitated and serum tissue samples were collected. The blood samples divided into serous fluid and with the Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) method, the testosterone, LH and FSH levels were determined. With the collected tissues of hypothalamus, the GnRH mRNA level of groups' were determined by using reverse transcription-polimeraz chain reaction (RT-PCR).

With the collected tissues of testicle, the structures of Seminife tubule and Germinal Epithelial were examined by hemotoxilen-eosine staining method.

Conclusion: The release of FSH and LH and the serum testosterone level increased in the experiment group, which exposed to 2 and 20 nmol/kg/240 μ l/days infusion of salusin β with icv method for seven days long, in comparison with the control and sham groups. Besides, average tubule diameter on the group which applied 2 nmol Sal- β is similar to control and sham groups, however average germinal epithelium thickness on examine group diminishes significantly compared to control and sham groups. On the other hand, germinal epithelium thickness and the diameter of tubule measured in the group which applied 20 nml sal- β increased significantly to control and sham groups and 2 nmol group.

Results: The parameter of the research indicates that Sal- β increases the level of serum testosterone and secretion of plasma LH and FSH. 2 nmol between which any difference has occurred during the application of the seminife tubule with a diameter of 20 nmol Sal- β has diminished in accordance with control and sham groups. These findings give the first signals that Sal- β can take significant role on the Hypothalamus-hypophysis testicular axis.

Keywords: Salusin- β , Hypothalamus, Hypophysis, Testicular, GnRH

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
ACAT1	: Asiltrensferaz 1
ADH	: Antidiüretik hormon
AgRP	: Agouti ile ilişkili transkript
Arc	: Arkuat çekirdek
BİK	: Beyin infüzyon kiti
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CART	: Kokain ve amfetamin transkripti
Cre	: Kreatinin
CRF	: Kortikotropin salgılama faktörü
CRH	: Kortikotropin serbestleştirici hormon
DM	: Diyabetes mellitus
DMH	: Dorsomedial hipotalamus
ELİSA	: Enzyme-linked immuno sorbent assay
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GDM	: Gestasyonel diyabetes mellitus
GHRH	: Büyüme hormonu serbestleştirici hormon
GLP-1	: Glukagon benzeri P-1peptid
GnIH	: Gonadotropin inhibe edici hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
LH	: Lüteinleştirici hormon
LHA	: Lateral hipotalamik alan
MCH	: Melanin konsantrasyonu hormonu
ME	: Medyan eminens
MN	: Magnoselüler nöron
MPN	: Medial preoptik çekirdek
NPY	: Nöropeptit Y
PCOS	: Polikistik over sendromu
RT-PCR	: Reverse transcription-polimeraz zincir reaksiyonu
PIH	: Prolaktin baskılayıcı hormon

PN	: Parvoselüler nöron
POMC	: Pro-opiomelanocortin
PVN	: Paraventriküler çekirdek
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polimeraz zincir reaksiyonu
Sal- α	: Salusin- α
Sal- β	: Salusin- β
SGA	: Gestasyonel yaş
SON	: Supra optik çekirdek
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
TRH	: Tiroid salgılatıcı hormon
VMH	: Ventromedial hipotalamus
VSMC	: Vasküler düz kas
yBOS	: Yapay beyin omurilik sıvısı



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Sal-β'nin amino asit dizilimi.....	8
Şekil 2.2. Hipotalamik çekirdeklerin yerleşimi.....	13
Şekil 2.3. Parvosellüller ve magnosellüller nöronların işlev mekanizması.....	14
Şekil 2.4. Hipotalamus ve hipofiz arasındaki anatomik ve fonksiyonel ilişki.....	16
Şekil 2.5. Testisin yapısı.....	19
Şekil 2.6. Seminifer tübül epitelyum yapısı.....	20
Şekil 2.7. Spermatogenik hücre serisi diyagramı.....	22
Şekil 2.8. Erkek hipotalamus-hipofiz-testiküler eksen feedback mekanizması.....	23
Şekil 3.1. Ozmotik mini pompaların doldurulması.....	26
Şekil 3.2. Beyin infüzyon kitinin infüze edilecek maddeler ile hazırlanması.....	27
Şekil 3.3. Anestezi sonrası sıçan kafa derisinin traş edilmesi.....	27
Şekil 3.4. Stereotaksik cihaza sıçanların yerleştirilmesi.....	28
Şekil 3.5. Bregma referans noktasının belirlenmesi.....	29
Şekil 3.6. Paxinos & Watson'a göre lateral ventrikül kornidatları.....	30
Şekil 3.7. Lateral ventrikülün matkap ile delinmesi.....	31
Şekil 3.8. Sıçanların ense bölgesine beyin infüzyon kiti ile bağlantılı olan ozmotik pompa yerleştirilmesi.....	32
Şekil 3.9. Serum LH ve FSH ELISA standart solüsyonunun dilüe edilmesi.....	34
Şekil 3.10. Serum LH ve FSH düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni.....	35
Şekil 3.11. Serum testosteron ELISA kit standartının dilüe edilmesi.....	36
Şekil 3.12. Serum testosteron düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni.....	36
Şekil 4.1. İcv Sal-β infüzyonunun GnRH mRNA ifadesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.2. İcv Sal-β infüzyonunun serum LH seviyesi üzerindeki etkisi.....	39
Şekil 4.3. İcv Sal-β infüzyonunun serum FSH seviyesi üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 4.4. İcv Sal-β infüzyonunun serum Testosteron seviyesi üzerindeki etkisi.....	41
Şekil 4.5. Kontrol gurubundaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü.....	42
Şekil 4.6. Sham gurubundaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü.....	42
Şekil 4.7. Düşük doz (2 nmol) Sal-β uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü.....	43

Şekil 4.8. Yüksek doz (20 nmol) Sal- β uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü	43
Şekil 4.9. Sal- β uygulamasının seminifer tübül çapı üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.10. Sal- β uygulanan canlıların germinal epitel kalınlığında meydana gelen değişiklikler	45



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Sal- α 'yı meydana getiren aa'ların birleşme oranları.....	4
Tablo 2.2. Sal- β 'nin amino asit sayısı	8
Tablo 2.3. Hipotalamusta salgısı gerçekleştirilen ve ön hipofiz bezinin salgısını düzenleyen serbestleştirici ve baskılayıcı hormonlar	15
Tablo 2.4. Ön hipofizde bulunan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar.....	17
Tablo 3.1. Grupların bilgisayar algoritması kullanılarak oluşturulması	24
Tablo 3.2. Yapay BOS içeriği.	26

1. GİRİŞ

2003 yılında Shichiri ve arkadaşları preprosalusinden köken alan salusin adını verdikleri çok fonksiyonlu biyoaktif peptit yapılı bir hormon keşfetmişlerdir (1). Salusin kökeni olan preprosalüsünün insanlarda dokular, kan serumu ve idrarda varlığı gösterilmiştir (1, 2). Bu hormon idrarda, kanda ve dokularda salusin- α (Sal- α) ve salusin- β (Sal- β) olmak üzere iki farklı formda bulunmaktadır (1-3). Birçok dokuda salusin her iki formu (α ve β) bulunmasına rağmen şimdiye kadar salusinler üzerine yapılan araştırmalar genellikle kardiyovasküler sistem üzerine yoğunlaşmış olup güçlü bir hipotansif etkiye sahip olduğu saptanmıştır (4-7).

Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda salusin iki formundan biri olan Sal- β 'nin birçok organda (mide, ince bağırsak, karaciğer, böbrekler, adrenal medulla, timus, lenf nodu, kemik iliği, dalak) çok iyi derecede eksprese edildiği belirlenmiştir (8-10). Ayrıca Sal- β 'nin ratların tükürük bezi, akciğer, adrenal korteks, iskelet kası, testis, kalp ve aortada ise çok az miktarda sentezlendiği immunohistokimyasal çalışmalar ile tespit edilmiştir (8). Sal- β varlığı tespit edilmiş organlardan biri olan hipotalamus, canlılığın devamının sağlanması ve üreme fonksiyonları açısından birçok mekanizmada düzenleyici bir görev üstlenmektedir. Hipotalamus: Homeostazisin sağlanması ve canlılığın devamı açısından önemli görevler üstlenen (11, 12), bünyesinde barındırdığı çekirdeklerin gerek kendi aralarında gerekse korteks ve beyin sapı gibi merkezi sinir sisteminin diğer bölgeleri ile sinirsel çift yönlü bağlantıları olan (13, 14), hipofiz ve testiküler yapı ile de hormonal yollarla etkileşim halinde bir organdır. Üreme ile ilgili önemli hormonlar hipotalamus-hipofiz-testiküler ekseninde sentezlenmektedir. Eksenin tepesinde bulunan ve salgıladığı hormonlar ile diğer organları uyaran hipotalamusta GnRH sentezlenirken, hipofizin ön bölgesinde FSH ve LH, gonadlarda ise seks steroidlerinin ve diğer hormonların sentezi gerçekleşmektedir. Hipotalamusta bulunan ve GnRH hormonu sentezleyen nörosekretuar nöronlar insanda mediobazal hipotalamusta lokalize olmakla beraber arkuat nükleus, median eminense ve suprakiazmatik alanın ventraline kadar karşılık gelen yaygın bir sahada bulunmaktadır. GnRH'nın hipofize taşınması kısa bir portal venöz sistemi ile gerçekleşmektedir. GnRH üreme döngüsünde; pubertenin başlatılmasını kontrol etmek ve hipofiz bezinden FSH ve LH sentezini uyarmak gibi önemli roller üstlenir (14, 15). GnRH uyarısıyla salgıları gerçekleşen bu iki hormon genel dolaşım yoluyla testislere ulaşarak burada testiküler

steroid sentezini ve spermatogenezi uyarır (11). GnRH'nın uzun süreli salınımı durumunda GnRH analogları, testesteron ve LH salınımını azaltırken; pulsatil salınımı fonksiyonel açıdan LH'nın pulsatil salınımını indüklemektedir. LH, testislerdeki Leydig hücrelerinin membranı üzerinde bulunan özgün reseptörlerine bağlanarak testosteron salınımını uyarır. FSH ise sertoli hücrelerini aktive ederek testosteron varlığında spermatogenezi uyarır (13-15). Kısaca hipotalamus-hipofiz-testiküler eksen üreme davranışından sorumlu olan hormonal mekanizmanın kontrolünü sağlayan önemli bir birimdir (11).

Sal- β 'nin hipotalamusun bazal bölgesinde bulunan medianeminens ile hipofiz ve testiste varlığı tespit edilmiş ayrıca sistematik dolaşım yoluyla arka hipofiz ve hipotalamus nöronları üzerinde baskı oluşturduğu belirlenmiştir (12). Hipotalamusta varlığının saptanması, hipotalamus ve hipofiz bezi üzerinde baskı oluşturduğunun belirlenmesi gibi veriler neticesinde Sal- β 'nin hipotalamus-hipofiz-testiküler aks üzerinde etkisi olabileceği fikrini akla getirmektedir (12). Literatür incelendiğinde sal- β 'nin hipotalamus-hipofiz-testiküler aksta fonksiyonel bir etkisinin olup olmadığı veya fizyolojik bir görevi varsa bunu hangi basamakta gerçekleştirdiğini ortaya koyan bir çalışma tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada intraserebroventriküler (icv) Sal- β uygulamasının üreme mekanizması üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma sadece olası bir etkinin varlığını ortaya koymak için değil bunun yanında etki mekanizmasında anlaşılmasına yönelik planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Salusinler

2.1.1. Tarihçesi & Sınıflandırılması

Salusinlerin varlığı Schichiri ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yayımlanan "Salusins newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities" başlıklı çalışmayla ortaya konmuştur (1). Salusin, aminoasit sayı ve dizimlemlerindeki farklılıklardan dolayı Sal- α ve Sal- β olmak üzere farklı iki alt başlık şeklinde isimlendirilmektedir.

2.1.2. Sal- α

Preprosalusinden köken alan, birçok doku ve organda varlığı tespit edilmiş, geniş bir sahada salgılandığı belirlenen, başta kardiyovasküler sistem olmak üzere farklı alanlarda fizyolojik roller üstlenen, 28 aminoasitten (aa) meydana gelmiş peptid yapılı bir hormondur (1, 2).

2.1.2.1. Biyokimyasal Yapısı

Sal- α ; 1 serin, 1 lizin, 1 glutamin, 2 lösin, 3 arjinin, 4 glisin, 7 prolin ve 9 adet alanin olmak üzere yapısında sekiz farklı olmak üzere toplamda 28 adet aa barındıran peptid yapılı bir hormondur (1, 2). Sal- α 'yı meydana getirirken aa'ların toplam yapıdaki oranları Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Sal- α 'yı meydana getiren aa'ların birleşme oranları (1, 2).

Aminoasit Adı	Bulunma Oranı (%)
Lizin	3.57
Arjinin	10.71
Glisin	14.28
Glutamin	3.57
Serin	3.57
Prolin	25
Lösin	7.14
Alanin	32.16

2.1.2.2. Sal- α Salgılanması ve Dokulardaki Lokalizasyonu

Sal- α c-DNA'dan üretilen 28 aminoasitli çok fonksiyonlu bioaktif peptidlerdir. Sal- α TOR2A (DYT1) fermin alternatif ürünü olan preprosalusinden sentezlenmişlerdir. Preprosalusin insanda böbrek ve damarlarda salgısının gerçekleşmesinin yanında insan plazması ve idrarda da varlığı tespit edilmiştir (1, 2). Preprosalusin salgısı böbrek ve damarlarda gerçekleşmesine rağmen, preprosalusinden köken alan Sal- α 'nın farklı organ ve dokularda sentezinin yapıldığı çok kez rapor edilmiştir. Sal- α 'nın ratlarda karaciğer, mide, adrenal medulla, böbrekler, ince bağırsak, timus, lenf nodu, kemik iliği, dalak başta olmak üzere tükürük bezi, iskelet kası, testis, akciğer, adrenal korteks ve kalp dokuda da varlığı gösterilmiştir (8, 9).

2.1.2.3. Sal- α 'nın Fizyolojik Roller

2.1.2.3.1. Kardiyovasküler Sistem ile İlişkisi

Sal- α ile ilgili farklı alanlarda yapılan birçok çalışma olmasına rağmen kardiyovasküler sistem (16-18), ateroskleroz ve arteriyel basınç üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar daha fazladır (19-21). Sal- α 'nın hipertansiyon üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada orta derece hipertansiyonlu hastalar ile sağlıklı bireylerin Sal- α seviyeleri kıyaslanmış olup, elde edilen veriler sonucunda hipertansiyonlu bireylerdeki Sal- α düzeyinin sağlıklı bireylere göre düşük olduğu rapor edilmiştir (22). Başka bir çalışmada koroner arter hastalığında Sal- α spesivitesi %93, sensivitesi ise

%82 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlarla Sal- α 'nın koroner arter hastalıklarının teşhis edilmesinde önemli bir ayıraç olduğu ileri sürülmüştür (5). Sal- α 'nın vasküler düz kas hücrelerine etkilerinin incelendiği insan ve sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarla vasküler düz kas hücrelerinde mitozu artırıcı bir etki oluşturduğu saptanmıştır (4-7). Sal- α 'nın aterosklerotik plaklar üzerindeki etkileri incelenmiş, serum Sal- α düzeyinin plak skoru ile orantılı bir biçimde azaldığı (5), Sal- α 'nın makrofaj köpük hücre formasyonunu baskılayarak (22) aterosklerotik lezyonları azalttığı tespit edilmiştir (5). Obesitede Sal- α 'nın etkilerinin incelendiği bir araştırmada, yüksek yağlı diyet verilerek aterosklerotik plak oluşturulmuş tavşanlarda Sal- α 'nın aşırı ekspresyonunun intimal hiperplaziyi inhibe ettiği belirlenmiştir (23). Miyokard infarktüsünde Sal- α seviyesini saptamak amacıyla gerçekleştirilen bir araştırmada, acil servise gelen miyokard infarktüslü hastalar ile gönüllü sağlıklı bireylerin Sal- α seviyeleri ölçülmüştür. Ölçüm sonunda elde edilen veriler, hasta bireylerdeki Sal- α düzeyinin kontrol grubundaki sağlıklı gönüllülere göre anlamlı derecede az olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular sonucunda kardiyovasküler sistemin sağlıklı işleyebilmesinde Sal- α varlığının önemli olduğu ileri sürülmüştür (24).

2.1.2.3.2. Boşaltım Sistemi ile İlişkisi

Sal- α böbreklerde varlığının tespit edilmiş (2, 3) olmasına rağmen bu organdaki fizyolojik rolleri tam olarak ortaya konamamıştır. Sal- α 'nın akut iskemik böbrek yetmezliği ile ilişkisini ve böbrek iskemik reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olup olmadığını ortaya koyabilmek amacıyla sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, böbrek yetmezliği üzerine etkileri ortaya konamazken, Sal- α 'nın böbrek iskemik reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olduğu gösterilmiştir. Özellikle iskemiye bağlı olarak böbrek dokusunda meydana gelen oksidatif hasarın Sal- α uygulaması ile azaldığı rapor edilmiştir (25).

Böbrek yetmezliği tanısı konan hastalarda, Sal- α 'nın serum düzeyleri ve böbrek yetmezliğinde idrarla atılımının araştırıldığı bir çalışmada serumda artan Sal- α konsantrasyonunun böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olabileceği gösterilmiştir (26). Mevcut literatür bilgileri değerlendirildiğinde Sal- α 'nın böbrek dokusu üzerinde meydana getirdiği etkiler birbiriyle kısmen çelişmektedir.

2.1.2.3.3. Sinir Sistemi ile İlişkisi

Multiple Skleroz, iltihaplanma, demiyelinizasyon, reaktif glioz ve nöronal hasar ile karakterize merkezi sinir sisteminin bir otoimmün hastalığıdır. Sal- α merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere birçok dokuda eksprese edilen bir hormondur (1-3). Sal- α 'nın, multiple skleroz hastalığı ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak amacıyla sadece bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada sağlıklı kontrol gurubundaki bireyler ile multiple sklerozlu hastaların Sal- α düzeyleri ölçülmüş ve elde edilen veriler neticesinde hasta bireylerdeki Sal- α seviyesinin sağlıklı bireylere oranla yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar multiple skleroz hastalığı ile Sal- α arasında bir ilişki olabileceğinin ilk sinyallerini oluşturmaktadır (27).

2.1.2.3.4. Diyabetes Mellitus ile İlişkisi

Yapılan bir çalışmada Sal- α 'nın diyabetes mellituslu hastalarda yüksek glikoz kaynaklı endotel hücre apoptozuna katkıda bulunduğu ve Sal- α üretiminin engellenmesi ile diyabetik aortada endotele bağımlı vazorelaksasyon, oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve nitratif stres geliştiği görülmüştür. Bu sonuçlar Sal- α 'nın patolojik endotelial disfonksiyonda önemli rol oynadığını göstermektedir (28).

Gestasyonel diyabetes mellituslu (GDM) annelerin sütlerinde preptin, Sal- α içerip içermediği ve plazma, süt preptin ve Sal- α arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Araştırmada GDM'li emziren kadınlar ve sağlıklı annelerden süt örnekleri alınmıştır. Elde edilen örneklerde Sal- α olup olmadığı araştırılıp, meme bezi dokularında Sal- α varlığı immünohistokimyasal olarak taranmıştır. Araştırma sonucunda GDM'li kadınların süt ve plazmalarında Sal- α seviyesinin düşük olduğu rapor edilmiştir (29).

2.1.2.3.5. Metabolik Sendrom ile İlişkisi

Metabolik sendrom, genetik veya çevresel faktörler ile ortaya çıkan; diyabet, obezite, anormal kan lipit düzeyleri ve yüksek tansiyon ile karakterize önemli bir sağlık problemidir. Fruktozun neden olduğu metabolik sendromlu sıçanlarda Sal- α ve Sal- β serum konsantrasyonu ve böbrek dokusundaki ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada, metabolik sendromlu grup ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Araştırma sonunda metabolik sendromlu grupta yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterolü, ürik asit ve diğer lipid parametreleri görülmüştür. Elde edilen kan serum örneklerinin

incelenmesi sonucunda, metabolik sendromlu grupta Serum Sal- α ve Sal- β seviyelerinin azaldığı ancak, böbrek dokusunda salusin seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir. Her iki peptidin de böbrek dokularında ekspresyonu metabolik sendromlu grupta daha yüksek bulunmuştur (30).

Yapılan başka bir çalışmada ise metabolik sendromlu sıçanların kalp ve aortunda Sal- α ve sal- β seviyelerinin azaldığı ileri sürülmektedir (31).

2.1.3. Sal- β

Sal- β , 20 aa'dan meydana gelen ve preprosalünden köken alan peptit yapılı bir hormondur (1, 2). Birçok doku ve organ tarafından sentezi gerçekleşip, farklı doku ve organlarda bulunmakla birlikte merkezi sinir sistemi içerisinde hipotalamusta da (6) varlığı tespit edilmiştir. Kardiyovasküler sistem (32, 33), boşaltım sistemi (34) gibi geniş bir sahada fizyolojik rollerine yönelik yapılan çalışmalar ile birlikte salgısının gerçekleştiği organları aydınlatmaya yönelik araştırmalarda mevcuttur (35-37).

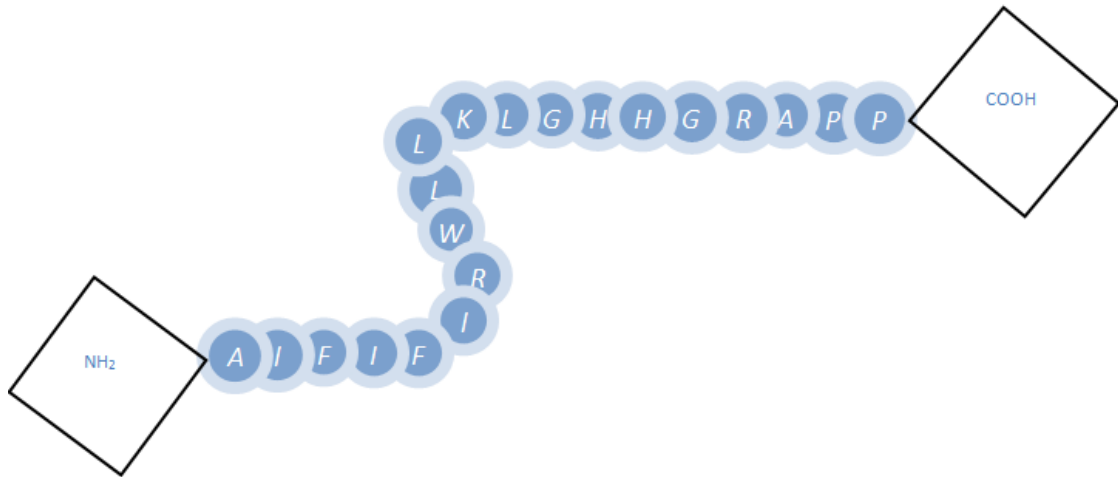
2.1.3.1. Biyokimyasal Yapısı

Sal- β 'nin biyokimyasal yapısını aydınlatmaya yönelik yapılmış olan araştırmalar sonucunda Tablo 2.2'de sayıları gösterilen prolin, alanin, lizin, histidin, triptofan, lösin, arjinin, fenilalanin, izolösin ve glisin olan on aminoasitin birleşmesiyle meydana gelen, toplamda 20 aa' sahip peptit yapılı bir hormon olduğu ortaya konmuştur.

Tablo 2.2. Sal-β'nin amino asit sayısı (39, 40).

Aminoasitler	Sal-β aa sayıları
Prolin	2
Lözin	3
Lizin	1
Alanin	2
Fenilalanin	2
Glutamin	-
Triptofan	1
Arjinin	2
Histidin	2
İzolözin	3
Glisin	2

Peptit bu on aminoasitin % 10 prolin,% 10 alanin, %5 lizin, %10 histidin, %5 triptofan, %15 lösin, %10 arjinin, %10 fenilalanin, %15 izölösin, %10 glisin birleşme oranlarıyla bir ucuna NH₂ bağlı olan alanin ile başlayan zincirin diğer ucunda COOH bağlı bulunan prolin ile sonlanmasıyla oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Sal-β'nin amino asit dizilimi (20aa) (A: Alanin. F: Fenilalanin. G: Glisin. H: Histidin. I: İzölözin. K: Lizin. L: Lösin. P: Prolin. R: Arjinin. W: Triptofan).

2.1.3.2. Salusin- β Salgılanması ve Dokulardaki Lokalizasyonu

Farklı aa sayısı ve birleşme oranlarından dolayı salusinini iki formu olarak isimlendirilen bu peptitlerin salgısı karaciğer, mide, adrenal medulla, böbrekler, ince bağırsak, timus, lenf nodu gibi aynı organlar tarafından gerçekleştirilmekte olup lokalizasyon yönünden de farklılık göstermemektedirler (1, 8).

2.1.3.3. Salusin- β 'nin Fizyolojik Rollerini

2.1.3.3.1. Kardiyovasküler Sistem ile İlişkisi

Sal- β 'nin farklı alanlardaki fizyolojik rollerini ortaya koymaya yönelik araştırmalar olmakla birlikte Sal- α gibi sistemik tansiyon, ateroskleroz ve kardiyovasküler sistem üzerindeki rollerini aydınlatmaya yönelik çalışmalar ağırlık kazanmaktadır. Izumiyama H. ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde salusinlerin kardiyak baskılamadaki rolünü inceleyen çalışma sonucunda Sal- β 'nin güçlü bir şekilde hipotansiyonu indüklediği rapor edilmiştir (4). Aydın S. ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada Sal- β 'nin çok güçlü bir hipotansif etkiye sahip olduğu ve bu etkisini vazodilatasyonu çok fazla etkilemeden gerçekleştirdiği belirlenmiştir (6). Bu peptit kolinerjik sistem mekanizmasını kullanarak antiadiposit etki ve kardiyomiyosit büyümeyi sonlandırmak suretiyle; hipotansiyon, düşük kalp hızı ve kardiyak disfonksiyon meydana getirir (41, 42). Bunların yanı sıra Sal- β fibroblastlar ile vasküler düz kas hücrelerinin poliferasyonunu uyarır. C-myc ve c-fos büyüme ile ilişkili genlerin oluşturulmasını tetikler. Bu durum aterosklerozun karakteristik özelliği olarak da gösterilir. Sal- β ve Sal- α 'nın etkilerinin benzer olduğu fakat Sal- β 'nin gösterdiği etkinin daha fazla olduğu ileri sürülmüştür (36). Sal- β , insanda kalp atardamarlarındaki aterosklerotik noktalarından çok fazla miktarda salgılanmaktadır. Aterosklerotik lezyonlar, vasküler düz kas (VSMC) ve fibroblastlarda yüksek miktarda bulunur ve makrofaj köpük hücre formasyonunu modüle eder (44). Ayrıca Sal- β asiltrensferaz 1 (ACAT1) ekspresyonunu artırır (45, 46). ACAT1'in Sal- β tarafından selektif regülasyonu, monosit-makrofaj diferasyonundan bağımsızdır. Sal- β 'nin makrofaj köpük hücre formasyonundaki etkisi arttırmak yönündedir. Aynı zamanda Sal- β parasempatik sistemi aktive ederek de hipotansiyon ve bradikardiye neden olur (4, 46).

2.1.3.3.2. Gastrointestinal Sistem ile İlişkisi

Yapılan çalışmalar Sal- β 'nin mide ve bağırsakta varlığı ortaya konmuştur (1, 35). Gastrik ülser hastalık modeli oluşturulan sıçanlardaki Sal- β seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada Sal- β 'nin tümör nekroz faktörü- α ve kaspas 3 seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir (47). Bir başka çalışmada ise Sal- β molekülünün N-terminal dizelerinin antimikrobakteriyel etkisinin güçlü olduğu ileri sürülmüştür (48).

2.1.3.3.3. Diyabetes Mellitus ile İlişkisi

Sal- β 'nin DM'li hastalarda etkisinin araştırıldığı bir çalışmada yüksek glikoz kaynaklı endotel hücre apoptozuna katkıda bulunduğu ve Sal- β üretiminin engellenmesi ile diyabetik aortada endotele bağımlı vazorelaksasyon, oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve nitratif stres geliştiği görülmüştür. Elde edilen bu bilgilerden yola çıkılarak; patolojik endotelial disfonksiyonda Sal- β 'nin önemli bir rol oynadığı ve DM vasküler yan etkilerinin tedavisinde de umut verici olduğu ileri sürülmektedir (28).

Gestasyonel diabetes mellituslu (GDM) kadınlarda ve gestasyonel yaş (SGA) fetüslerinde maternal ve kord serum Sal- β yoğunlaşması değerlendirildiğinde: GDM ve SGA'larda hem maternal hem de kord kanda salusin- β ortalama konsantrasyonlarının azaldığı saptanmıştır. Bu veriler ışığında düşük Sal- β seviyesinin, metabolik bozukluklar ve vasküler disfonksiyonu artırıcı bir etkiye neden olabileceği belirtilmiştir (29).

2.1.3.3.4. Üreme Sistemi ile İlişkisi

Polikistik over sendromlu (PCOS) kadınların serum Sal- β düzeyinin araştırıldığı bir çalışmada, PCOS'lu vakalarda Sal- β seviyesinin daha yüksek olduğu ayrıca serum Sal- β seviyesinin insülin direncinde LH, FSH ve toplam testosteron seviyeleri ile birlikte doğru orantılı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu verilerle Sal- β 'nin PCOS'lu kadınların kan serumu içinde arttığı ortaya konmuştur (49).

Sal- β 'nin yumurtalık kanseri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kanserli hücrelerin proliferasyonunu ve epitelyal mezenkimal geçişini hızlandırdığı tespit edilmiştir. Sal- β 'nin yumurtalık kanserinde belirteç rolü oynayabileceği ileri sürülmektedir (52).

2.1.3.3.5. Boşaltım Sistemi ile İlişkisi

Böbreklerde varlığı tespit edilmiş (37) olan Sal-β'nin iskemik reperfüzyonlu böbrekte etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, süperoksit dismutaz (SOD) ve plazma glutatyon ve eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-PX) enzim aktivasyonunu arttırıp, malondialdehit (MDA), tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-1 (IL-1B) seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Sal-β'nin iskemiye uğramış böbrekte kreatinin (Cre) düzeyini azalttığı ve böbrek iskemi hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür (25).

2.1.3.3.6. Merkezi Sinir Sistemi ile İlişkisi

Sal-β sistemik dolaşım yoluyla arka hipofiz ve hipotalamus nöronları üzerinde baskı oluşturmaktadır (38). Sal-β'nin hipotalamus ve arka hipofizde sınırlandırılmış, santral ve periferik sistemlerin su alımının kontrolünde zıt etkileri olan endojen bir parasempatometik peptit olduğu ileri sürülmüştür (53). Saito ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada deneysel olarak dehidratasyona maruz bırakılıp, tuz yüklemesi yapılan sıçanlarda Sal-β miktarının hipotalamusta; supraoptik nükleus (SON), paraventriküler nükleus (PVN), medianeminense (ME) ve arka hipofizde önemli derecede arttığı rapor edilmiştir (12). Yapılan başka bir çalışmada Sal-β'nin MrgprA1 reseptörü üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma sonunda MrgprA1 reseptörünün orta beyindeki dopamin nöronları üzerinde Sal-β'nin nöroprotektif etkilerine aracılık ettiği saptanmıştır. Sal-β uygulanmasının orta beyin dopamin nöronlarının canlılığının devam etmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca Sal-β reseptörünün inhibisyonu, MrgprA1 üzerindeki Sal-β'nin nöro-koruyucu etkilerini ortadan kaldırdığı belirtilmiştir. Araştırma sonunda Sal-β'nin orta beyin dopamin nöronları üzerinde nöroprotektif etkilere sahip olduğu ve parkinson hastalığı için de etkili bir terapötik tedavi olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir (50).

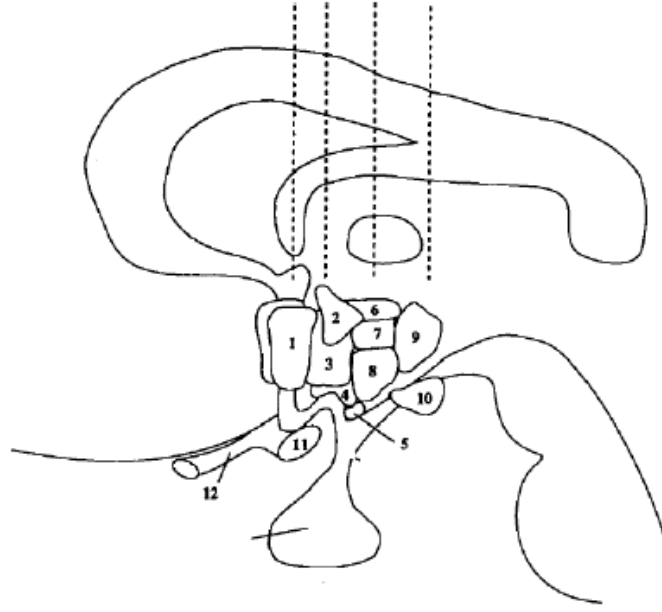
2.2. Hipotalamus

Hipotalamus; gönderdiği uyarılara çevre dokular ve merkezi sinir sistemi tarafından verilen cevaplar neticesinde düzenleyici görevler üstlenen, merkezi sinir sisteminin mediobazal bölümde talamusun ventrali ile hipofiz bezinin arka kısmında yer alan önemli bir yapıdır. Memeliler de merkezi sinir sisteminde çok küçük bir yer kaplamasına karşın önem teşkil eden fizyolojik görevleri vardır.

Hipotalamustan gönderilen uyarılara verilen yanıtlar neticesinde canlılığın devamı için gerekli olan önemli olaylar düzenlenir. Hipotalamus canlı organizmanın devamlılığının sağlanması için enerji metabolizması, besin alımı, su tüketimi gibi hayati fonksiyonların kontrolünde önemli görevler üstlenir (54-56). Dışarıdan alınan besin maddelerinin sindirimi gerçekleştiikten sonra kan dolaşımı yoluyla hormonlar veya metabolitler hipotalamusa gelir ve besin alımının sonlandırılması veya devam ettirilmesi için gerekli olan uyarılar hipotalamustan çıkar (57, 58). Ozmolitenin sağlanmasında önemli bir faktör olan renal tübüllerdeki su emilimi de hipotalamus tarafından düzenlenir (59-61). Yakın dönemde yapılan çalışmalar, neredeyse tüm beyin bölgelerinin metabolik homeostaz için ikincil role sahip olduğunu göstermesine rağmen, Arcuate Nucleus (Arc) başta olmak üzere hipotalamik çekirdeklerin homeostazın korunması açısından birincil role sahip olduğunu ortaya koymuştur (62).

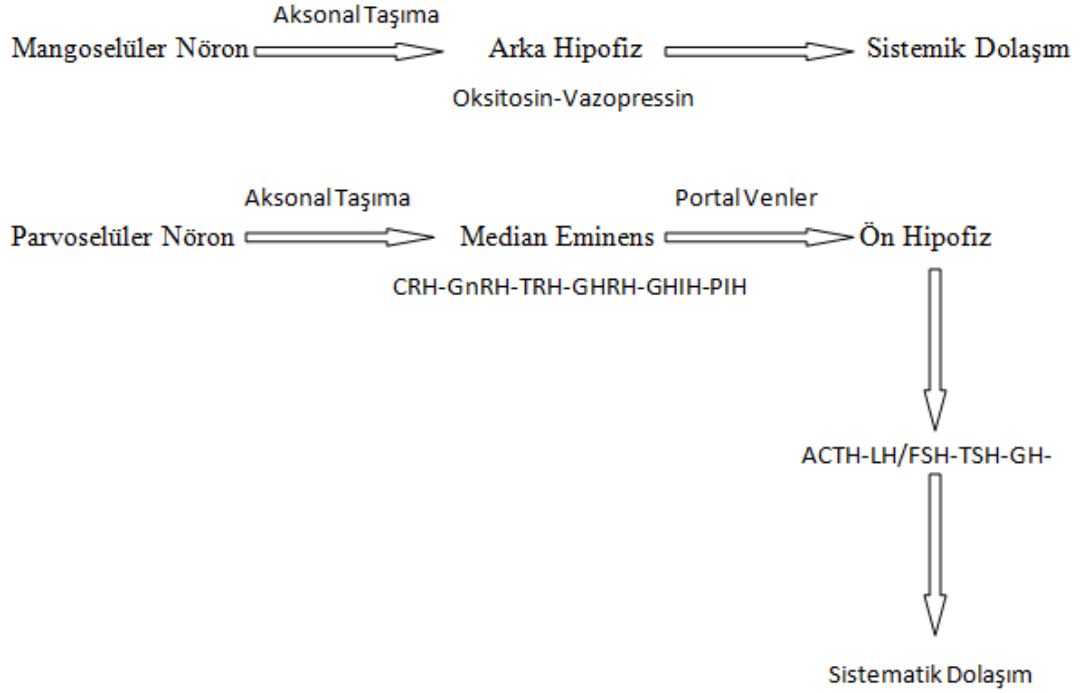
2.2.1. Hipotalamik Nükleuslar

Hipotalamus merkezi sinir sisteminde küçük bir alan kaplamasına rağmen, metabolizmanın düzenlenmesi bakımından farklı görevler üstlenen çekirdekleri barındırır (Şekil 2.2). Bu çekirdekler; periventriküler, medial ve lateral olmak üzere üç bölgede veya preoptik, supraoptik, tuberal ve mamillar olmak üzere 4 alanda bulunmaktadır (63). Hipotalamus, canlılığın devamını sağlamak ve homeostaziyi düzenlemek amacıyla üstlendiği karmaşık görevleri yerine getirebilmesi için beynin farklı bölgeleriyle sinirsel iletişim kuran afferent ve efferent nöronlara sahiptir.



Şekil 2.2. Hipotalamik çekirdeklerin yerleşimi (65). (1, preoptik ekirdek; 2, paraventriküler çekirdek; 3, anterior hipotalamik alan; 4, supraoptik çekirdek; 5, arkuat çekirdek; 6, dorsal hipotalamik alan; 7, dorsomedial çekirdek; 8, ventromedial çekirdek; 9, posterior hipotalamik alan; 10, mamillar cisim; 11, optik kiazma; 12, optik sinir)

Hipotalamusta endokrin faaliyetlerin yürütülmesinde Şekil 2.3'te gösterildiği gibi magnoselüler ve parvoselüler olarak adlandırılan iki nöron çeşidi vardır. ME'yi kat ederek hipofizin arka bölümünde noktalanan Magnoselüler nöronlar (MN) arka hipofizde ADH ve oksitosin salınımının kontrol edilmesinde önemli rol oynamaktadır (63). Parvoselüler nöronlar (PN) ise hipofiz ön bölümünün kontrolünü hipotalamus tarafından salgılanan baskılayıcı ve salgılayıcı hormonları vasıtası ile sağlamaktadır (64).



Şekil 2.3. Parvosellüller ve magnosellüller nöronların işlev mekanizması.

2.2.2. Hipotalamusta Salgılanan Hormonlar ve Fonksiyonları

Hipotalamus merkezi sinir sisteminde anatomik olarak küçük bir alana sahip olmasına rağmen hayati öneme sahip roller üstlenmiştir (66). Bu fizyolojik roller arasında; enerji dengesi, vücut sıcaklığının düzenlenmesi, sıvı alımının düzenlenmesi, besin alımı, üreme, kan basıncı, uykunun düzenlenmesi gibi yaşamsal olaylar yer almaktadır (67). Hipotalamus, homeostazisin sağlanması açısından önemli rol oynayan bu görevlerini hormonal ve nöronal mekanizmalar ile gerçekleştirmektedir. Bünyesindeki endokrin faktörler; tirotropin serbestleştirici hormon (TRH), gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH), kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH), prolaktin baskılayıcı hormon (PIF) olarak isimlendirilmektedir (Tablo 2.3; 11). Hipotalamus, hipofiz bezini endokrin yollar ile uyayarak uygun fizyolojik yanıtların oluşmasını sağlamaktadır (68-70).

Tablo 2.3. Hipotalamusta salgısı gerçekleştirilen ve ön hipofiz bezinin salgısını düzenleyen serbestleştirici ve baskılayıcı hormonlar (68-74). (PVN= Paraventricüler Nükleus, SON= Supraoptik nükleus, ARN= Arkuat nükleus, MPN= Medial preoptik nükleus).

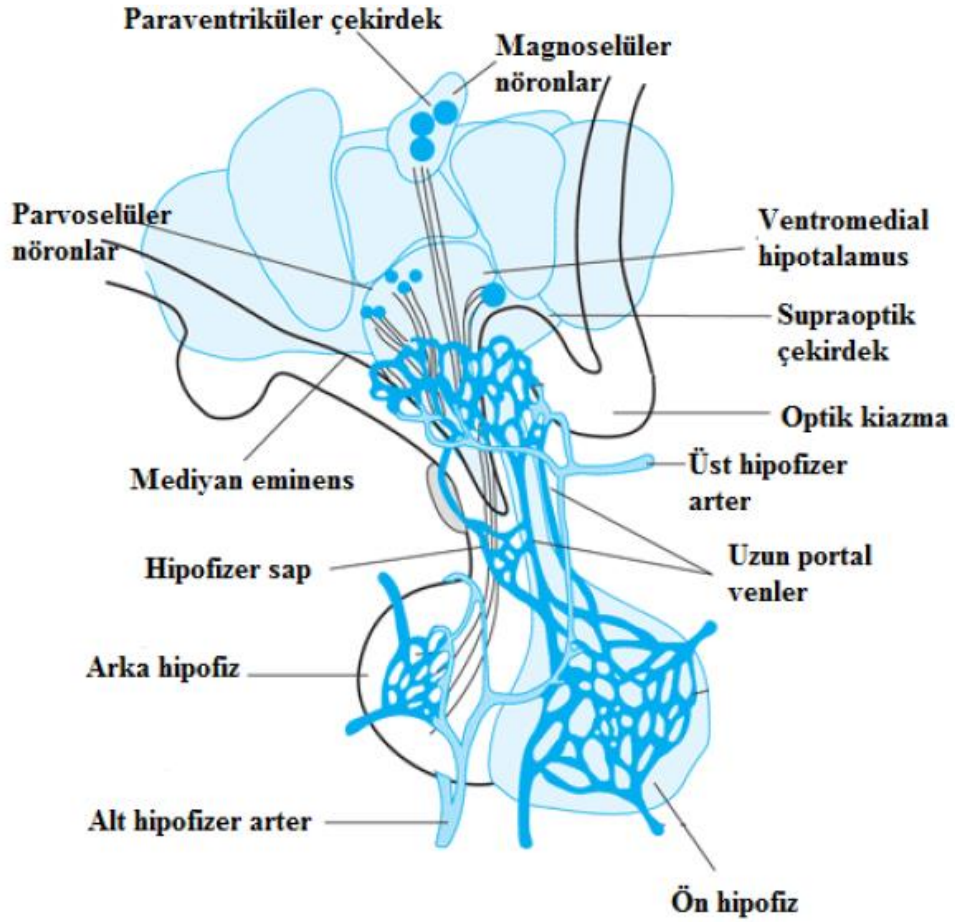
Hipotalamik Faktör	Hipotalamik nükleus	Ön hipofiz salgısı	Etki ettiği hücre grubu
TRH	PVN	TSH, Prolaktin	Tirotrop
GnRH	PVN	LH, FSH	Gonadotrop
	SON		
	ARN		
CRH	MPN	ACTH	Kortikotrop
	PVN		
GHRH	ARN	GH	Somatotrop
GHIH (Somatostatin)	PVN	GH	Somatotrop
PIF	ARN	Prolaktin	Laktotrop

2.3. Hipofiz

Hipofiz bezi; sella turcica olarak adlandırılan kemik bir kovuğun içerisinde, diaphragma sellale olarak isimlendirilen duranın kıvrımı tarafından kaplanmış, insanlarda 05-1 gr ağırlığında ve yaklaşık olarak 1 cm çapında enerji metabolizması, stres, büyüme, üreme ve diğer fizyolojik olaylarda önemli görevleri olan bir organdır. Perifer organlar ile hipotalamus arasındaki fizyolojik sinyal alışverişleri hipofizde gerçekleşir. Hipotalamus ile arasındaki anatomik ve fizyolojik bağlantı infundibular sap üzerinden ME vasıtası ile gerçekleşmektedir. Bu yapı yoluyla hipotalamik faktörlerin hipofiz bezine erişimi sağlanır (75).

2.3.1. Hipofiz Bezi Anatomisi

Hipofiz bezi işlevsel ve anatomik bakımdan adenohipofiz (ön hipofiz) ve nörohipofiz (arka hipofiz) olmak üzere iki bölüme ayrılır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hipotalamus ve hipofiz arasındaki anatomik ve fonksiyonel ilişki (76).

Adenohipofiz: Yapısal ve işlevsel olarak üç bölüme ayrılmıştır.

- 1) Pars tüberalis, tüberalin olarak isimlendirilen bir faktör ile prolaktin salgı mekanizmasını aktive eder (77). Birden fazla katmandan oluşan alt hipofizyel sapın dış kısmını kuşatan yapıdır.
- 2) Pars intermedia, ön ve arka hipofizle komşuluğu olan Rathke kesinin kütle ve hacim olarak küçülmüş uzantısı şeklindeki insanlarda çok fazla gelişmemiş hipofizin orta kısmıdır. Buna karşın düşük omurgalılarda melanin sekresyonunu ve dağıtımını kontrol eden önemli bir yapıdır (78).
- 3) Pars distalis, işlevsel bakımdan farklı hücre yapılarını bünyesinde bulunduran adenohipofizin beş'te dördük kısmını meydana getiren ön kısmıdır. Bu bölümde büyüme faktörleri ve sitokinleride kapsayan farklı hormonların üretimi gerçekleşmektedir (79). Ön hipofiz bezindeki hormonların salgısı hipotalamus tarafından düzenlenir (79). Hipotalamusta özellikle nöron

grupları tarafından oluşturulan baskılayıcı ve serbestleyici hormonlar hipotalamus-hipofiz portal sistem vasıtası ile ön hipofize ulaşır. Ön hipofiz endokrin faktörleri salgılayarak uygun fizyolojik yanıtın oluşmasını sağlamaktadır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Ön hipofizde bulunan hücre grupları ve salgıladıkları hormonlar (79).

Hücre Gurubu	Hormon	% Hücre miktarı
Lakatotroplar	PIH	15
Gonadotroplar	LH, FSH	10
Tirotroplar	TSH	5
Somatroplar	GH	45-50
Kortikotroplar	ACTH	15-20

(PIH: Prolaktin inhibe edici hormon, LH: Lüteinleştirici hormon, TSH: Tiroid uyarıcı hormon, GH: Büyüme hormonu, ACTH: Adrenokortikotropik hormon)

Nörohipofiz, pituisit olarak isimlendirilen, değişime uğramış ve özelleşmiş glia hücrelerinden oluşan hipofizin arka kısmıdır. Nörohipofiz hipotalamusta üretimi gerçekleşen bazı maddelerin kana ulaşımını gerçekleştirir. Nörohipofizde herhangi bir madde üretimi mevcut değildir. Hipotalamustaki MN olarak adlandırılan hücrelerde üretimi gerçekleşen oksitosin ve antidiüretik hormonu (vazopressin) aksonal yol ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla arka hipofize ulaştırır.

2.4. Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks Bileşenleri

2.4.1. GnRH'nın Hipotalamasutan Salgılanması

10 aa'dan meydana gelen GnRH ilk olarak daha sonrasında prohormona dönüşecek olan bir prephormon şeklinde üretilir. Bu formunda, GnRH peptidi, bir uçta iletim sinyali sekansı ile diğer uçta ise GnRH-associated peptid ile sarılmış haldedir. Bu yapı enzimatik işlemlerden geçtikten sonra ME'nin dış kısımlarında depolama granülleri şeklinde taşınıp, aksonlarda paketlenmektedir (71). GnRH nöronları hipotalamusun rostral kısmında bulunan preoptik alan ve yakın bölgelerinde bulunmaktadır. Koordineli bir şekilde işlev görmesine rağmen sinir ağı şeklinde dağınık bir yayılım gösterdiği ileri sürülmüştür (71). Nöronal uyarı neticesinde GnRH salgısı, hipotalamus bünyesinde bulunan ARN, PVN, MPN ve SON çekirdeklerinde devamlı

olmamakla beraber 1-2 saatte bir meydana gelen ve 5-25 dakikalar arasında devam eden pulsatil tarzda salınımlar şeklinde gerçekleşir (63, 72).

GnRH etkisini hipofizin ön lobundaki gonadotropinlerden FSH ve LH salgılarını uyararak göstermektedir (73, 74).

2.4.2. Hipofiz Bezinden FSH ve LH Salınması

Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks'ın ikinci bileşeni olan hipofizde LH ve FSH salgıları gerçekleşmektedir. FSH, alfa ve beta olarak isimlendirilen iki farklı alt birimden meydana gelen glikoprotein yapıda bir hormondur. Alfa 89 aa, beta ise 112 aa içermektedir (63). Reseptör için bağlanma bölgesi alfa'da bulunurken, biyolojik etkilerin meydana geldiği kısım beta'dır.

Hipofizin ön lobundan GnRH'nın uyarıcı etkisi sonucu oluşan FSH'nın yarı ömrü 1-3 saattir (67). Testislere FSH'nın önemli etkisi spermatogenez ve sertoli hücrelerini uyarmasıdır (80).

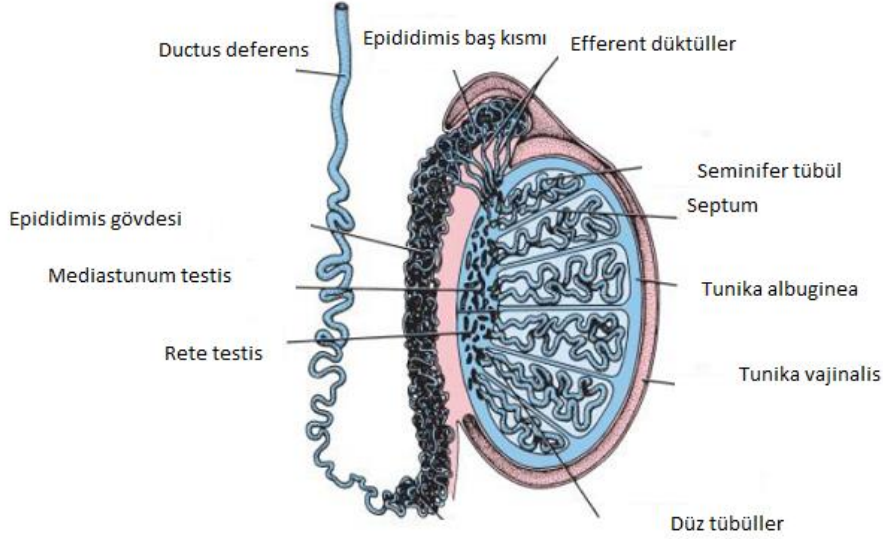
GnRH'da meydana gelen az miktardaki değişiklikler FSH salınımı üzerinde bir etki oluşturmaz. GnRH'da oluşan uzun müddetli uyarılara FSH ancak birkaç saat sonra cevap verir (63). GnRH'dan ön hipofiz gonadotroplarına gelen iletiler neticesinde gerçekleşen LH'nın salınımı ise FSH'nın aksine pulsatil tarzda olup GnRH'daki anlık değişimlere eşlik ettiği rapor edilmiştir (81, 82). LH'da FSH gibi alfa ve beta olmak üzere iki alt bölümden meydana gelen glikoprotein kaynaklı bir hormondur. Alfa bölümü 89 aa, beta ise 115 aa'dan oluşmaktadır (63). LH'nın erkek üreme sistemi açısından önemi testislerindeki Leydig hücrelerine etki ederek testosteron salınımını uyarmaktır.

2.5. Testislerin Yapısı ve Fonksiyonları

2.5.1. Testis Anatomisi

Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks'ın son kompartmanı olan testisler; skrotum olarak adlandırılan muskofasial bir kese içerisinde asılı duran, her biri ortalama 3 cm eninde ve boyu 5 cm olan tübüler bezlerden (83, 84) oluşmaktadır. Her birinin ağırlığı 15 ile 19 gr arasında olan tunika albuginea olarak isimlendirilmiş yapı taşı bağ dokusu olan bir kapsül ile çevrelenmiştir (83). Tunika albugineanın testisin arka kısmında

oluşturduğu medaistinum testis adı verilen bölümünde fibröz semptomlar vasıtası ile 250 civarında primidal bölgeye ayrılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Testisin yapısı (83).

Başlangıcı epididimis olan devamında duktus deferens, duktus ejakulatoris yapıları bulunan ve üretra ile sonlanan sperm kanalları, üretilmiş olan spermleri depolama ve vücut dışına atma görevini üstlenir. Epididimis, içerisinde geçerken hareket ve yumurtayı dölleyebilme yeteneğini kazanmış spermleri ejakülasyona kadar muhafaza eder.

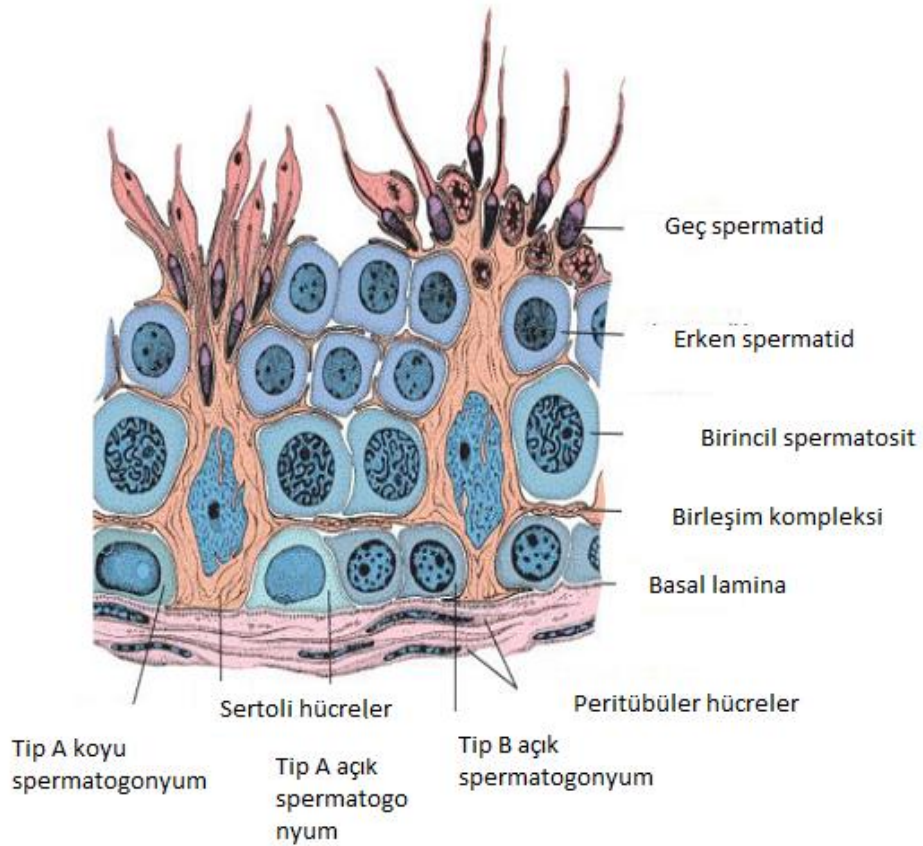
2.5.2. Testis Histolojisi

Skrotum olarak adlandırılan muskofasial bir kese içerisinde asılı duran, her biri ortalama 3 cm eninde ve boyu 5 cm olan tübüler bezdir (83, 84). Herbirinin ağırlığı 15 ile 19 gr arasında olan tunika albuginea, bağ dokusu olan bir kapsül ile çevrelenmiştir (83). Tunika albugineanın testisin arka kısmında oluşturduğu medaistinum testis adı verilen bölümünde fibröz semptomlar vasıtası ile 250 civarında primidal bölgeye ayrılır (83, 85). Testise giriş çıkışta genital boşaltım yolları ve damarlar mediatinumun içerisinde kat eder (83, 84). Testisteki her bölme, leydig (intersitisyel) hücreleri barındıran bağ dokusundan meydana gelmiş stroma ve içerisinde sperm üretimi gerçekleşen 1-4 seminifer tübülü barındırmaktadır. Lobül içerisindeki her bir tübül

daireysel yörüngeler oluşturarak kendi üzerine katlanır. Epididimin baş tarafına bağlanmış olan duktile efferents 10-20 adet olup düz tübül ile rete testisin birleşiminden meydana gelmiştir. Bu yolaklar vasıtasıyla spermatazoonlar ve testis sıvısı epididimisin proximal bölümüne ulaşır (83-86).

2.5.2.1. Seminifer Tübül Epitel

Seminifer tübül; Şekil 2.6'da gösterildiği gibi her bir testiste 250-1000 arasında bulunur. 30-70 cm uzunluğunda, 150-200 µm çapında ve erişkinlerde günlük spermatazoid üretimi 2×10^8 adettir (85).



Şekil 2.6. Seminifer tübül epitelyum yapısı (83).

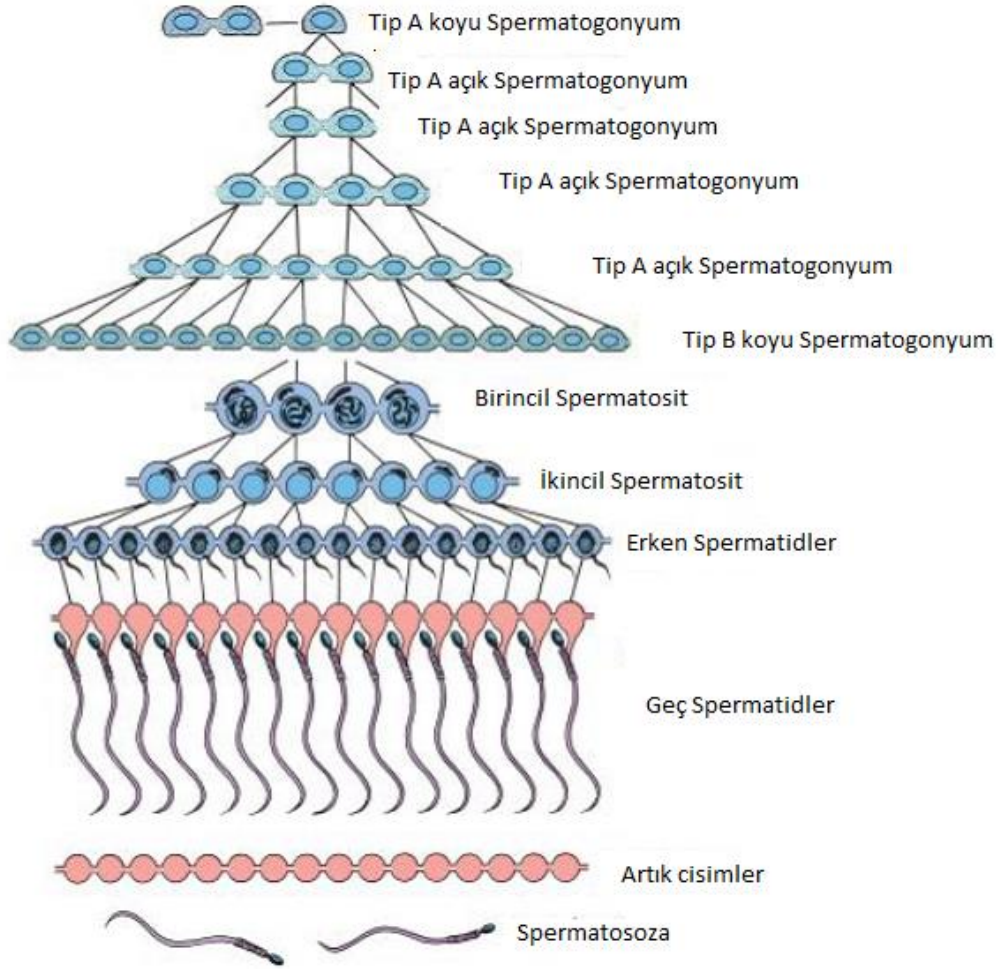
Seminifer tübül arasındaki boşlukların önemli bir kısmını intersitisyel (Leydig) hücreleri doldurur. Bazal laminaya sınırı olan en içteki kısmı ise miyoid hücreleri barındırmaktadır.

2.5.2.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, sınırları kesin olarak bilinmemekle birlikte alt kısımları bazal laminaya tutunmuş, tepe bölgeleri ise seminifer tübülün lümen kısmına uzanmış durumdadır (83, 85). Sertoli hücrelerinde yağ damlacıkları, çok sayıda lizozom, mitokondri, granülsüz endoplazmik retikulum, az miktarda ise granüllü endoplazmik retikulum ve gelişmiş golgi cisimciği elektron mikroskobu ile tespit edilmiştir (85, 86). Sertoli hücreleri; başta spermatogenez olmak üzere kan-testis bariyerinin meydana getirilmesi, devam eden spermatojenik hücrelerin beslenmesi ve desteklenmesi, testiküler transferin sentez ve salgısı, androjen bağlayıcı roteinin sentezi ve salgılanması gibi önemli görevler üstlenir (83).

2.5.2.2.1. Sertoli Hücrelerinin Sperm Yapımındaki Fizyolojik Rolü

Sperm yapımı, hipofiz bezi tarafından salgısı gerçekleşen FSH hormonunun uyarımıyla testislerde bulunan sertoli hücrelerinde gerçekleşir. Sperm oluşumu spermatogenez olarak adlandırılan ve yaklaşık 64 gün süren bir süreç ile meydana gelir. Spermatogenez; spermatogonyumlardan olgun germ hücrelerinin oluşmasını sağlayan spermatositogenez, mayoz faz ile spermiyogenez olmak üzere üç fazdan oluşan bir süreçtir. Birinci faz olan spermatositogenez sürecinde spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek primer spermatositlere dönüşürler. Bu aşamada tip A ve tip B spermatogonyumları meydana getirilir. Spermatojenik serinin temel yapısı olan tip A spermatogonyumlardan bir ya da daha fazla mitoz bölünme ile tip B spermatogonyumları meydana gelir. Daha sonra sertoli hücrelerine dahil olan tip B spermatogonyumları büyüyerek primer spermatositlere dönüşür. Spermatosit fazında primer spermatositler birinci mayoz girip kromozom sayısını ve DNA miktarlarını azaltarak sekonder spermatositleri meydana getirirler. Daha sonra sekonder spermatositler interfaz aşamasına girmeden ikinci mayozun profaz aşamasına geçerler. İkinci mayotik bölünmenin metafaz safhasında kromozomlar metafaz plağında dizilirler. Daha sonra kardeş kromatidler ayrılarak mekiğin zıt kutuplarına hareket eder. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında her bir sekonder spermatositten 23 tek iplikli kromozom ve iki haploid spermatid meydana gelir. Daha sonra DNA içeriği olarak haploid yapıda olan spermatidler Şekil 2.7'de gösterildiği gibi golgi fazı, kep fazı, akromozom fazı ve olgunlaşma fazından meydana gelen 4 aşamadan oluşan bir süreçle olgun spermlere dönüşürler (83).



Şekil 2.7. Spermatogenik hücre serisi diyagramı (83).

2.5.2.3. Leydig Hücreleri

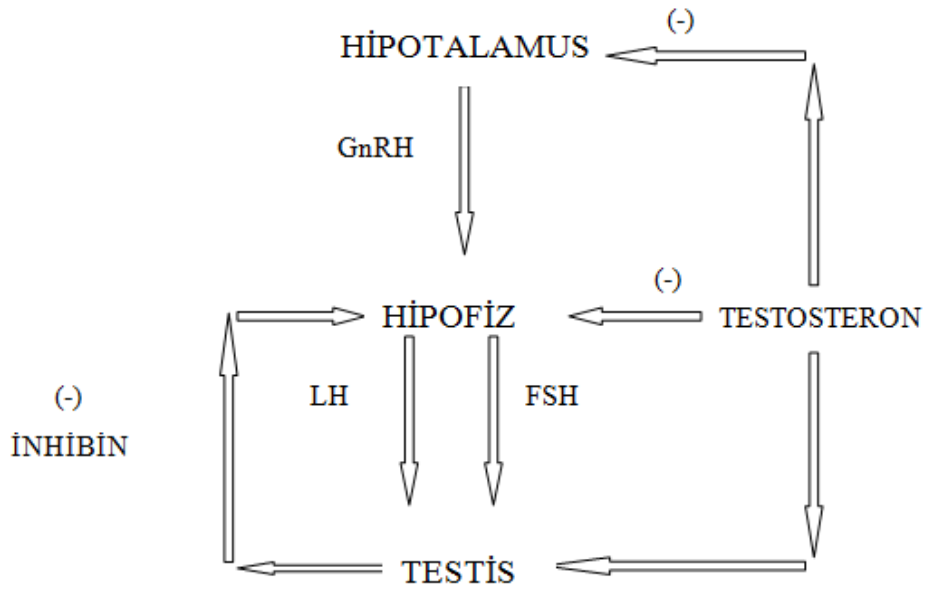
İntersitisyel doku androjen üretiminin gerçekleştiği, içerisinde lenf damarları, sinirler, bağ dokusu, pencere kapillerleri barındıran ve testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluğu dolduran alandır. İçerisindeki önemli yapılar; granülsüz endoplazmik retikulum, poligonal, lipid damlacıkları, tubüloveziküler kristal mitokondriyonları ve eoziniflikleri barındıran leydig hücreleridir. Fetal dönemin ortalama olarak 5. ayında inaktif oldukları peryoda girerken erkek fetüsün erken farklılaşma döneminde aktiftir.

İntersitisyel alanda bulunan leydig hücreleri kristal mitokondriyonlar, düz endoplazmik retikulum ve lipid damlacıkları içeren (87, 88); intertübüler alan, lenfatik

kanal ve kan damarları veya sinozoidler yakınında yerleşmiş testosteron sentezinin gerçekleştiği hücrelerdir.

2.6. Hipotalamus-Hipofiz-Testiküler Aks'ın Düzenlenmesi

Hipotalamus-hipofiz-testiküler ekseninin kontrolünde önemli role sahip olan hipotalamusta (MPN, SON, ARN ve PVN) GnRH sentezlenerek aksonal yolla ME'ye taşınır. Daha sonra ön hipofize hipotalamo-hipofizyal portal sistem vasıtası ile ulaşan GnRH burada bulunan gonadotrop hücrelerden FSH ile LH salınımını uyarır. Salgılanan LH ve FSH etkilerini testislerde bulunan hedef hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak cAMP ikincil habercil sistemi aktive etmesi sonucunda gerçekleştirir. LH testislerdeki Leydig hücrelerinde testosteron salınımını indüklerken, FSH sertoli hücrelerinde spermatogenez başlatır (89-91). Ayrıca FSH'nın sertoli hücrelerini uyarması sonucunda inhibin salınımı da gerçekleşir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Erkeklerde hipotalamus-hipofiz-testiküler eksen feedback mekanizması.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu tarafından alınan onay ile (02-11-2017 tarih ve 2017/A-55) çalışmadaki bütün uygulamalar etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde, İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜTF-DEHÜM), Tıp Fakültesi Fizyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Deneysel Hayvanlarının Gruplara Ataması

Çalışmada 250-270 gram ağırlığında *Wistar Albino* cinsi toplam 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneye başlamadan önce hayvanlar tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Belirlenen vücut ağırlıklarına göre hayvanların gruplara ataması, bilgisayar algoritmasına dayalı basit rastgele atama yöntemi ile yapıldı (MedCalc 12.7.0 for Windows) ve tek yönlü varyans analizi bulgularına göre gruplar arasında hayvanların ağırlıkları açısından fark olmadığı tespit edildi (Tablo 3.1; $p=0.273$).

Tablo 3.1. Grupların bilgisayar algoritması kullanılarak oluşturulması

Gruplar	Ağırlık (g)				<i>p</i>
	Kontrol	Sham	2 nmol Sal- β	20 nmol Sal- β	
Hayvan sayısı (n)	10	10	10	10	
Ortalama	264.53	261.25	261.86	263.29	0.273
SD	15.26	14.81	13.29	16.22	
En küçük	240.28	237.12	239.52	243.29	
En büyük	285.18	285.22	282.72	284.41	

3.2. Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada, kullanılan sıçanlar kontrol, sham, düşük ve yüksek doz Sal- β uygulanan grup olmak üzere 4'e ayrıldı ($n=10$). Hayvanlar deneysel süreç boyunca bireysel olarak tekli kafeslerde tutuldu.

Grup 1: Kontrol grubu olup 7 gün süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. 7. günün sonunda gruptaki sıçanlar kurban edilerek kan, beyin (hipotalamus) ve testis dokuları toplandı.

Grup 2: Sham grubu olup sıçanların lateral ventrüküllerine beyin infüzyon kiti yerleştirilerek, beyin infüzyon kitine ozmotik mini pompa bağlandı ve sıçanlara 7 gün süreyle yapay beyin omurilik sıvısı (yBOS; Sal- β çözücüsü) infüzyonu yapıldı (10 μ l/saat). 7. günün sonunda gruptaki sıçanlar sakrifiye edilerek kan, beyin (hipotalamus) ve testis dokuları toplandı.

Grup 3: Düşük doz uygulama grubu olup sıçanların lateral ventrüküllerine beyin infüzyon kiti yerleştirilerek, beyin infüzyon kitine ozmotik mini pompa bağlandı ve sıçanlara 7 gün süreyle 2 nmol Sal- β infüzyonu yapıldı (10 μ l/saat). 7. günün sonunda gruptaki sıçanlar sakrifiye edilerek kan, beyin (hipotalamus) ve testis dokuları toplandı.

Grup 4: Yüksek doz uygulama grubu olup sıçanların lateral ventrüküllerine beyin infüzyon kiti yerleştirilerek, beyin infüzyon kitine ozmotik mini pompa bağlandı ve sıçanlara 7 gün süreyle 20 nmol Sal- β infüzyonu yapıldı (10 μ l/saat). 7. günün sonunda gruptaki sıçanlar sakrifiye edilerek kan, beyin (hipotalamus) ve testis dokuları toplandı.

Deney süresi boyunca kafeslerin bulunduğu ortam, 21-22 °C sıcaklık aralığında ve 12 saat aydınlık/karanlık periyodu olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar *ad libitum* olarak standart sıçan yemi ile beslendiler ve normal musluk suyu içtiler.

3.3. Gruplardaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneylede kullanılan hayvanların sayısı, hayvanların deneye başlama ağırlık ortalaması yaklaşık 262 gr, standart sapması 18 gr, %5 sapma, tip 1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) (Güç=0.80) olduğunda her bir grupta en az 10 hayvan olacak şekilde güç analizi ile belirlendi.

3.4. Hazırlık

3.4.1. Yapay Beyin Omurilik Sıvısının Hazırlanması

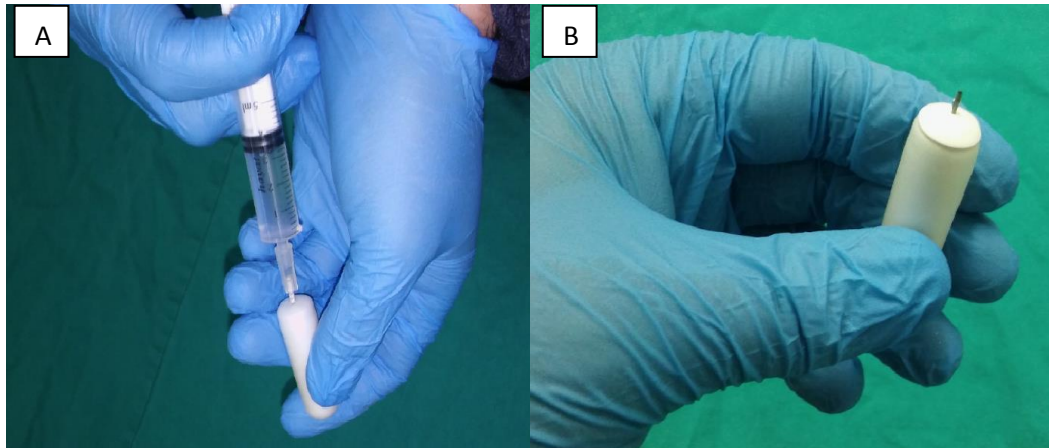
Tablo 3.2'de içerikleri belirtilen X ve Y solüsyonları 500 ml distile suda hazırlandı. Sonrasında X ve Y solüsyonları hacimce eşit oranda olacak şekilde karıştırılarak yBOS hazırlandı (92).

Tablo 3.2. Yapay BOS içeriği.

X solüsyonu		Y solüsyonu	
İçerik	Gram	İçerik	Gram
CaCl ₂ ·H ₂ O ₂	0.206	Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O ₂	0.214
NaCl	8.66	Na ₂ H ₂ PO ₄ ·H ₂ O ₂	0.027
MgCl ₂ ·6 H ₂ O ₂	0.163		
KCl	2.224		

3.4.2. Ozmotik Pompaların ve Beyin İnfüzyon Kitinin Hazırlanması

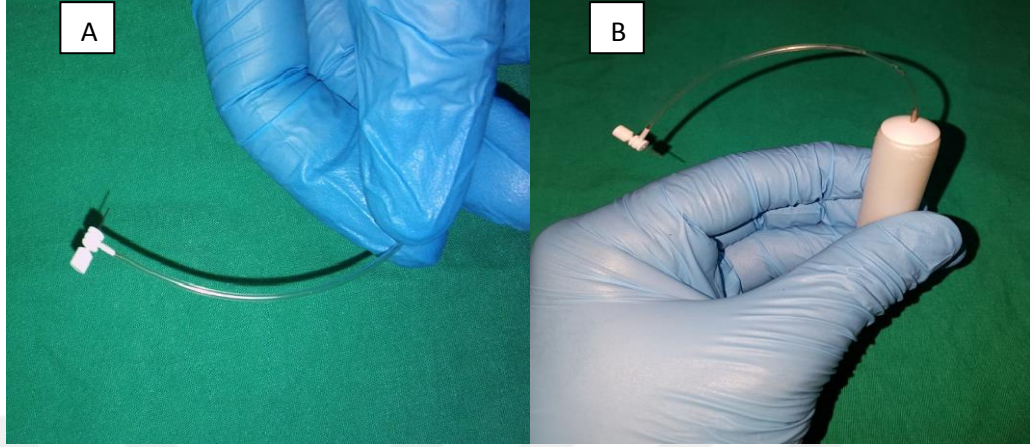
Çalışmada deney gruplarına 2 ve 20 nmol Sal-β; sham gurubuna ise yBOS infüzyonu uygulayabilmek amacıyla 10 µl/saat hacminde 7 gün süresince infüzyon yapabilen ozmotik mini pompalar (Alzet 2ML1, ABD) kullanıldı. Bu pompa seti ile birlikte gönderilen künt bir iğne ucu ile infüze edilen maddeler (yBOS, 2 ve 20 nmol Sal-β) ile dolumu gerçekleştirildi (Şekil 3.1A). Set içerisinde yer alan metal kanüllü kapak infüzyon kitine bağlanmak amacıyla takılarak kullanıma hazır hale getirildi (Şekil 3.1B).



Şekil 3.1. Ozmotik mini pompaların doldurulması (A), metal kanül kapağın ozmotik mini pompaya takılması.

Sonrasında sıçan lateral ventrikülüne enjeksiyon yapacak şekilde dizayn edilen (vertikal eksen için iğne uzunluğu 4.8 mm) beyin infüzyon kitleri (Alzet brain infusion kit 1, ABD) kullanıldı. Kitlerle beraber gelen özel kanüller beyin infüzyon kitine Şekil 3.2A'da gösterildiği gibi takıldı ve içeriği infüze edilecek maddelerle (kontrol için

yapay BOS, deney grupları için (2 ve 20 nmol Sal- β) hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu. Daha sonra beyin infüzyon kitine ozmotik mini pompa bağlanarak infüzyona hazır hale getirildi (Şekil 3.2B).



Şekil 3.2. Beyin infüzyon kitinin infüze edilecek maddeler ile hazırlanması (A), Beyin infüzyon kitinin ozmotik mini pompaya yerleştirilerek kullanıma hazır hale getirilmesi (B).

3.4.3. Deneye Başlanması

3.4.3.1. Sıçanlarda icv infüzyonun gerçekleştirilmesi

İntramüsküler olarak sıçanlara 70 mg/kg ketamin (Richter Pharma AG, Avustralya), 8 mg/kg ksilazin (Bioveta PLC, Çek Cumhuriyeti) uygulanarak sıçanlar anestezi altına alındı. Sıçanların parmak kıstırma yanıtları ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda anestezi altına girdikleri belirlendi ve spontan hareketleri kaybolan sıçanların kafa derileri traş edildi. (Şekil 3.3).



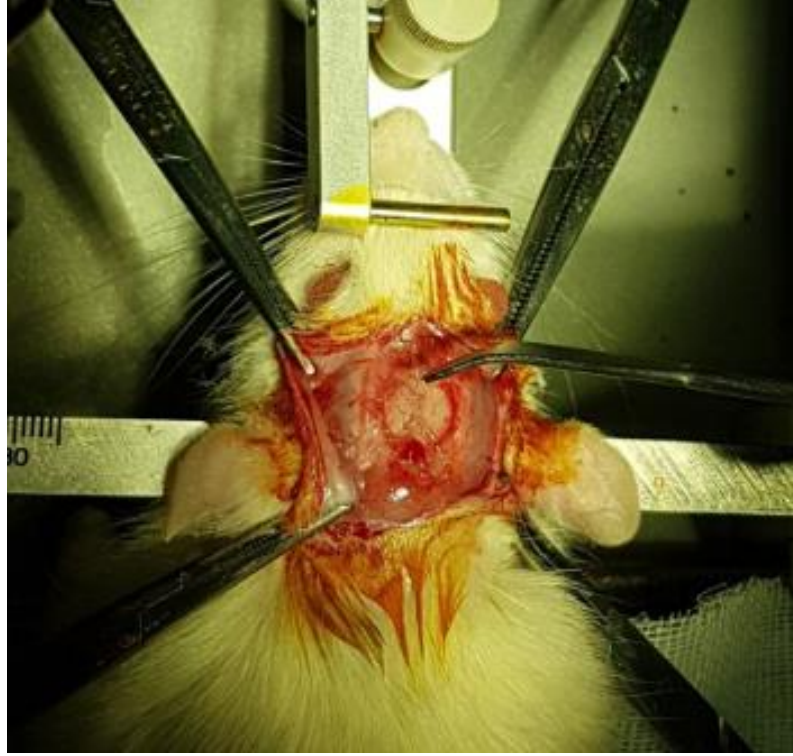
Şekil 3.3. Anestezi sonrası sıçan kafa derisinin traş edilmesi.

Operasyon için hazır hale getirilen sıçanlar başlarının üst kısmı zemine paralel olacak bir biçimde Şekil 3.4' de gösterildiği gibi ağız ve kulaklarından stereotaksik cihaza yerleştirildi (Small Animal Stereotaxic System, ASI Instruments, ABD).



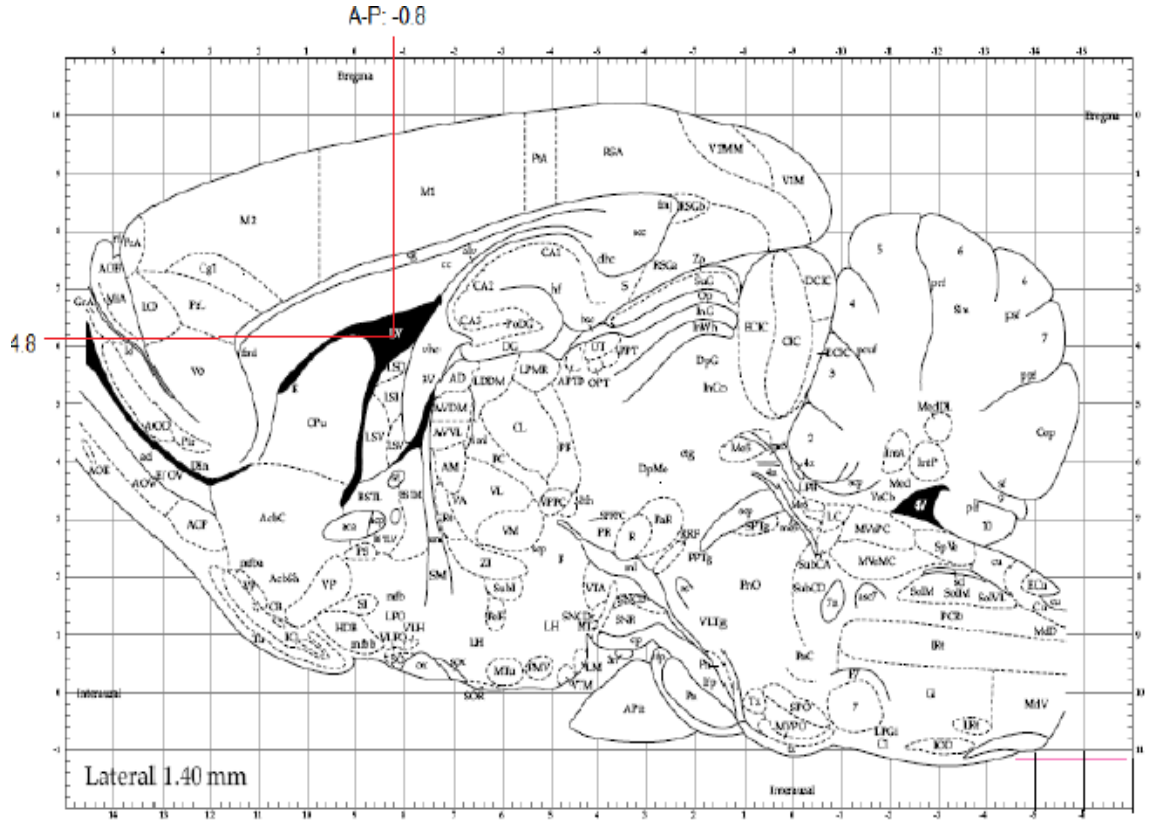
Şekil 3.4. Stereotaksik cihaza sıçanların yerleştirilmesi.

Başın üst kısmında bulunan deri operasyon öncesi %10'luk povidon iyodin ile temizlendi ve bistüri ile kesilerek kemik yapı açığa çıkarıldıktan sonra bregma noktasına ulaşıldı (Şekil 3.5).



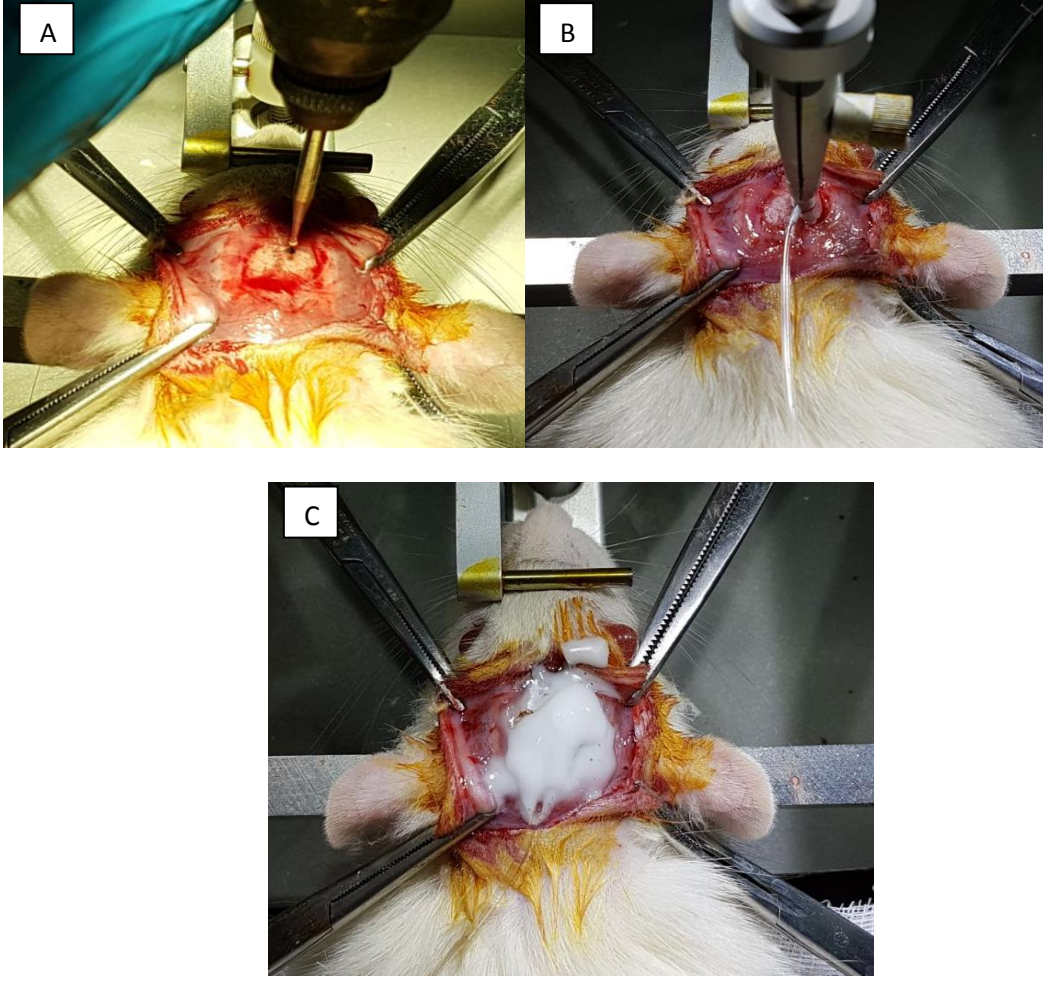
Şekil 3.5. Bregma referans noktasının belirlenmesi.

Stereotaksik kordinatlar Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (90). Bregma noktası tespit edildikten sonra, bregmaya göre referans alınarak 0.80 mm posteriyor (kaudal) ve 1.40 mm lateral olacak şekilde streotaksik cihazda, lateral ventriküle giriş noktası belirlendi (Şekil 3.6).



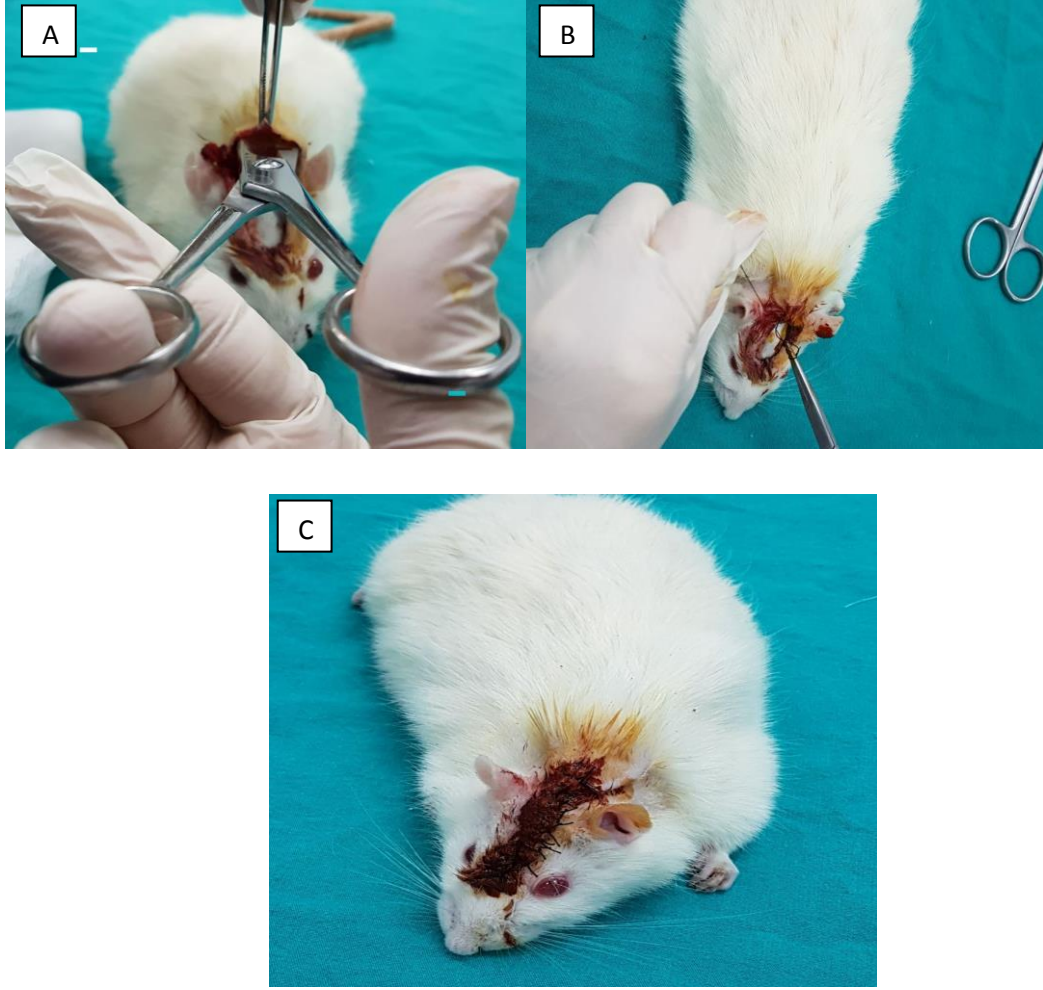
Şekil 3.6. Paxinos & Watson'a göre lateral ventrikül kornidatları (90).

Koordinatlar belirlendikten sonra belirlenmiş nokta matkap ile delindi (Şekil 3.7A). Stereotaksik cihaz üzerindeki özel alzet tutucuya kalıcı kanül yerleştirildi ve açılmış olan bölümden lateral ventriküle Şekil 3.7B'de gösterildiği gibi inildikten sonra beyin infüzyon kiti dış yapıştırıcısı vasıtası ile sabitlendi (Şekil 3.7C).



Şekil 3.7. Lateral ventrikülün matkap ile delinmesi (A), alzet tutucu ile kalıcı kanülün lateral ventriküle indirilmesi (B), beyin infüzyon kitinin dental cement yardımıyla kemik yapıya sabitlenmesi.

Sıçanların ense bölgesine beyin infüzyon kiti ile bağlanan ozmotik pompa Şekil 3.8A'da gösterildiği gibi yerleştirildi. Daha sonra hayvanlar kafese alınmadan önce insizyon bölgesi dikildi (Şekil 3.8B). Ense ve kafa derileri dikildikten sonra hayvanların insizyon bölgesine %10 povidon iyodin sürülerek tekli kafeslere alındı (Şekil 3.8C).



Şekil 3.8. Sıçanların ense bölgesine beyin infüzyon kiti ile bağlantılı olan ozmotik pompa yerleştirilmesi (A), hayvanlar kafese alınmadan önce insizyon bölgesi dikilmesi (B), hayvanlar kafese alınmadan önce %10 povidon iyodin sürülmesi

3.4.3.2. Deneyin Sonlandırılması ve Dokuların Toplanması

Deney sonunda sıçanlara anestezi altında ötenazi tekniği kullanılarak kan örnekleri, testis ve beyin (hipotalamus) dokuları alındı. Alınan beyin dokuları kuru buzda hızlıca donduruldu ve reverse transcription-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri yapıncaya kadar (-80°C)'de derin dondurucu da saklandı. Kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı ve elde edilen serumlar; LH, FSH ve testosteronun hormonal analizleri yapıncaya kadar derin dondurucuda (-80°C) saklandı. Histolojik çalışmalar için alınan testisler, bağlı dokulardan ayrılarak tartılıp, %10 formol içeren solüsyonlara bırakıldı ve daha sonra histolojik olarak, seminifer tübül yapıları değerlendirildi.

3.5. Analizlerin Yapılması

3.5.1. RT-PCR Analizleri

Hipotalamusda ki GnRH mRNA seviyelerinin tespiti için gruplardan alınan doku örnekleri buz üzerinde steril şartlarda küçük parçalar halinde kesilerek RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve bu dokulardan Roche firmasının ürettiği “High Pure RNA Tissue kit” (lot no: 10156400, ref no:12033674001) kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Önce 20 mg doku tartıldı ve üzerine 350µl “Lysis Buffer” eklendi. Daha sonra homojenizatörde 13,500 rpm hızda 1 dak. homojenize edildi. Daha sonra homojenizatörün üzerine hacminin yarısı kadar etanol eklendi bu karışım vortekslenildikten sonra 13000xg’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolonun altındaki koleksiyon tüpü dökdü ve tekrar takılarak işleme devam edildi. Daha sonra kolona 100 µl “Dnase” eklendi ve 15 dak. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 500 µl Wash buffer I eklenerek ve 8000xg’ de 1 dak. oda sıcaklığında santrifüj edildi, üzerine 500 µl Wash buffer II eklendi ve 8000xg’ de 1 dak. oda sıcaklığında santrifüj edildi. Daha sonra üzerine 300µl Wash buffer II eklendi ve 13000xg’de 2 dak. oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası koleksiyon tüpü atıldı ve kolon steril bir ependorf tüpe alındı bu işlemten sonra kolona 100 µl “Elüsyon buffer” eklendi ve 8000xg’de 1 dak. oda sıcaklığında santrifüj edildi tüpte toplanan sıvı total RNA olarak elde edildi. Elde edilen RNA’dan cDNA sentezi için Roche firmasının ürettiği “Transcriptor First strand cDNA Synthesis” kiti (Lot no:14585924, Ref no: 04896866001) kullanıldı. cDNA sentezi kitin protokolüne uygun şekilde yapıldı. Kısaca 100 µl’lik PCR tüpüne 77 ng toplam RNA, 1 µl OligodT18 (50 pmol/µl), 1 µl Random Hexamer Primer (600 pmol/µl) ve toplam hacim 13 µl olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65 °C’de 10 dak. PCR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4 µl “Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer”, 0,5 µl “Protector RNase Inhibitor”, 2 µl DeoxynucleotideMix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0,5 µl “Transcriptor Reverse Transcriptase” enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20 µl oldu. Karıştırılan numuneler PCR makinesinde 25 °C’de 10 dak., 55 °C’de 60 dak. ve 85 °C’de 5 dak. ısıtıldı daha sonra -20 °C’de analize kadar saklandı. Gerçek zamanlı PCR analizi; Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PCR cihazı, Roche firmasının ürettiği “Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Lot no: 10048800, Ref no: 06402682001)” ve “Real Time Ready Assay (β-Actin lot no: 90015222, Config no: 100081783) hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı.

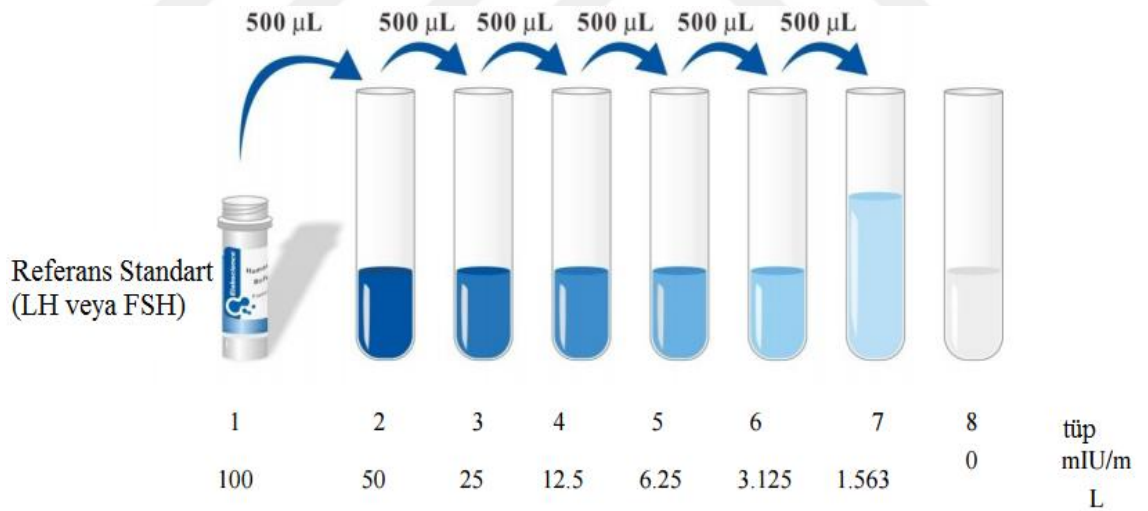
Reaksiyonlar 10 µl toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5 µl master mix, 0,5 µl real time ready mix, 2 µl PCR kalitesinde su ve 2,5 µl cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı.

3.5.2. Hormon ve Biyokimyasal Parametrelerin Tayini

ELISA analizleri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı. Serum LH (Elabscience, E-EL-R0026), FSH (Elabscience, E-EL-R1106) ve testosteron (Cayman, 582701) seviyelerini belirlemek için sıçan spesifik ELISA kitleri kullanıldı.

3.5.2.1. Serum LH ve FSH Düzeyinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Serum LH ve FSH seviyelerini belirlemek için ELISA kiti ile birlikte gelen deney protokolü uygulandı. Analizlere başlamadan önce kit içinde bulunan 100 mIU/mL konsantrasyona sahip standart, dilüsyon buffer solüsyonu kullanılarak Şekil 3.9'da belirtildiği gibi seyreltildi.



Şekil 3.9. Serum LH ve FSH ELISA standart solüsyonunun dilüe edilmesi.

Hazırlanan standartlar, numuneler, ELISA tamponu ve antikor, 96 kuyucuklu ELISA Kit plağına Şekil 3.10'da gösterildiği gibi pipetlendi.

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

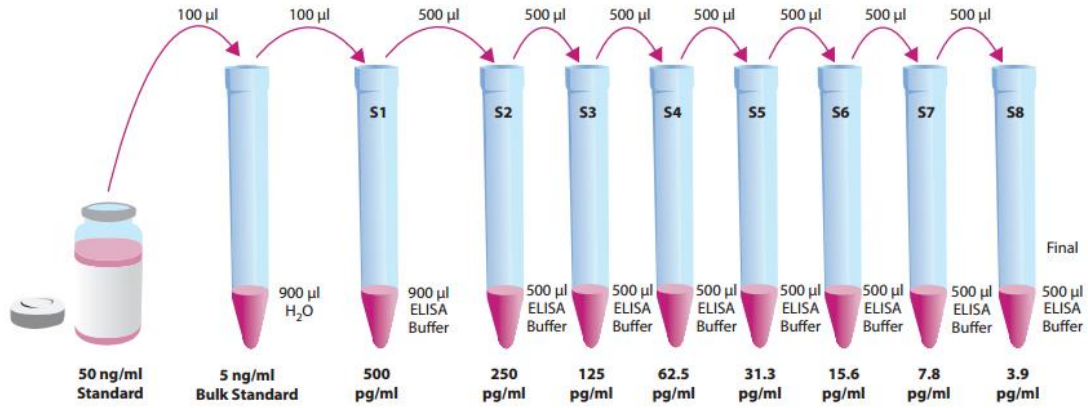
Şekil 3.10. Serum LH ve FSH düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni.

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

- Standart, kör (blank) veya örnekler 100 µL hacminde plak düzeninde gösterildiği şekilde pipetlendi.
- Plaka 37 °C’de 90 dak. inkübe edildi ve inkübasyon sonrası 100 µL Biotinylated Detection Ab. Reaktif eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Yıkama solüsyonu ile (her kuyucuğa 0,35 ml) plak 3 defa yıkandı. En son yıkamadan sonra plate kağıt havluya ters çevrilerek vuruldu.
- Tüm kuyucuklara 100 µl Streptavidin-HRP konjuge solüsyonu eklendi ve 30 dak. 37 °C’de inkübe edildi.
- Yıkama solüsyonu ile (her kuyucuğa 0,35 ml) plak 5 defa yıkandı. En son yıkamadan sonra plate kağıt havluya ters çevrilerek vuruldu.
- Her kuyucuğa 90 µL substrat solüsyonu eklendi ve plak aliminyum folyoyle sarılarak gün ışığı engellendi. Plak 15 dak. 37 °C’de inkübe edildi.
- Renk gelişimini durdurmak için tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi.
- 450 nm dalga boyunda ELISA plate okuyucusunda okuma yapıldı ve sonuçlar ng/ml olarak hesaplandı.

3.5.2.2. Serum Testosteron Seviyelerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Sıçanların serum testosteron seviyesini belirlemek için ELISA kiti ile birlikte gelen deney protokolü uygulandı. Analizlere başlamadan önce kit içinde bulunan 50 ng/mL konsantrasyona sahip standart, dilüsyon buffer solüsyonu kullanılarak Şekil 3.11’de belirtildiği gibi seyreltilti.



Şekil 3.11. Serum testosteron ELISA kit standartının dilüe edilmesi.

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

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

Şekil 3.12. Serum testosteron düzeyinin belirlenmesinde kit plağının düzeni. (S1-8:

Standart eklenen kuyucuk, BLK: Boş kuyucuk, N1-40: Serum numunesi, NSB: Spesifik olmayan bağlayıcı, B₀: Maksimum bağlayıcı, TA: Total aktivite)

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

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

3.5.3. Testis Histolojisi

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 µm kalınlığında alınan kesitler genel morfolojik yapının değerlendirilmesi için hematoksilin-eozin boyama metodu ile boyandı (94)

Leica Q Win görüntü analiz sistemi kullanılarak, her preparattan 20x büyütmede, VIII. aşamada bulunan en az 10 adet seminifer tübülün çapı ve epitel kalınlığı ölçüldü.

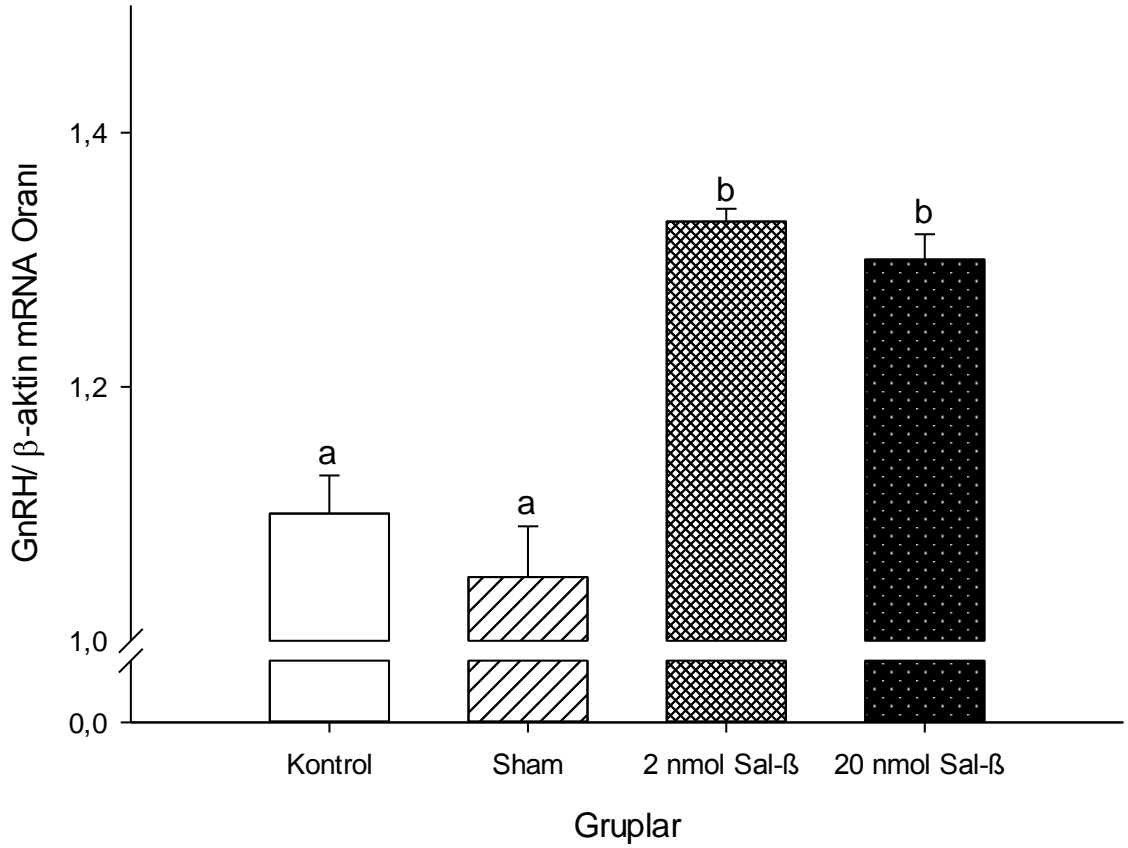
3.5.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, IBM SPSS istatistiksel yazılım programı (SPSS for Windows version 22) ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluğun belirlenmesinde Shapiro Wilk testi kullanıldı. Gruplar arası nicel değişkenlerin karşılaştırılması Kruskal Wallis H testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama ± standart sapma olarak özetlendi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel açıdan önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İcv Salusin- β İnfüzyonunun GnRH mRNA Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Sal- β uygulamasının hipotalamus GnRH mRNA ifade düzeyinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre uygulanan Sal- β hem 2 hemde 20 nmol konsantrasyonu hipotalamusta GnRH mRNA seviyesini arttırdı ($p < 0.05$).

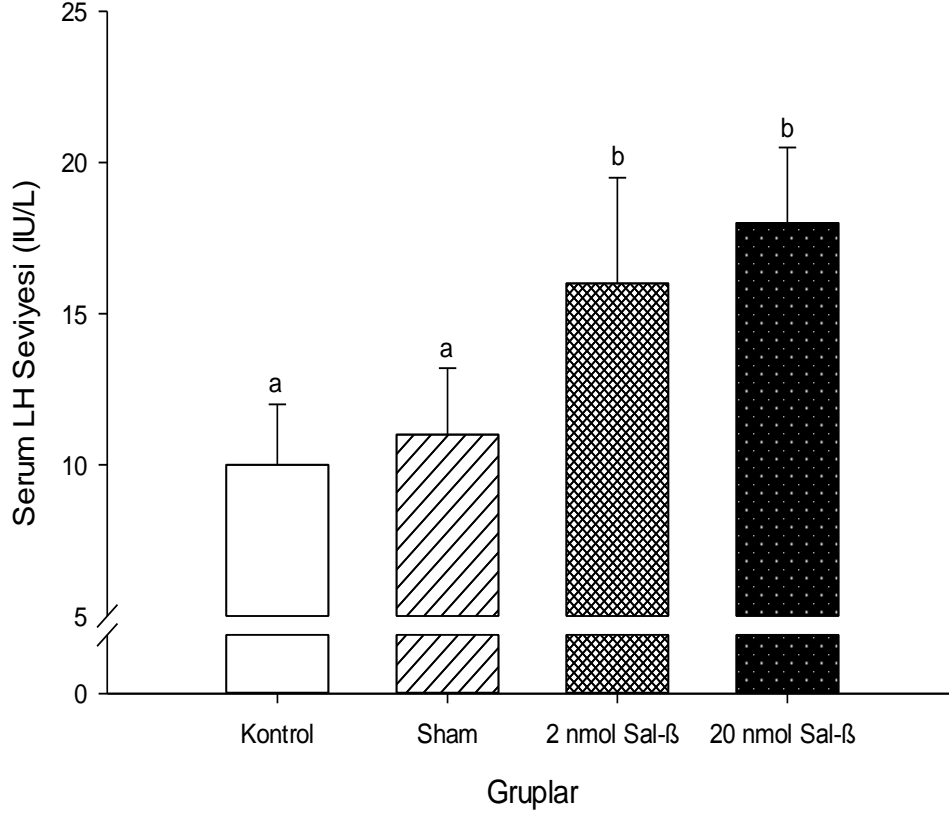


Şekil 4.1. İcv Sal- β infüzyonunun GnRH mRNA ifadesi üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama standart \pm sapma olarak özetlendi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermekte olup, ^{a,b} $p < 0.05$).

4.2. İcv Salusin- β İnfüzyonunun Serum LH Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Kontrol, sham, 2 ve 20 nmol Sal- β uygulanan gruplardaki sıçanların serum LH seviyelerinde ki değişiklikler Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda kontrol ve sham grubu arasında serum LH seviyesi bakımından önemli bir

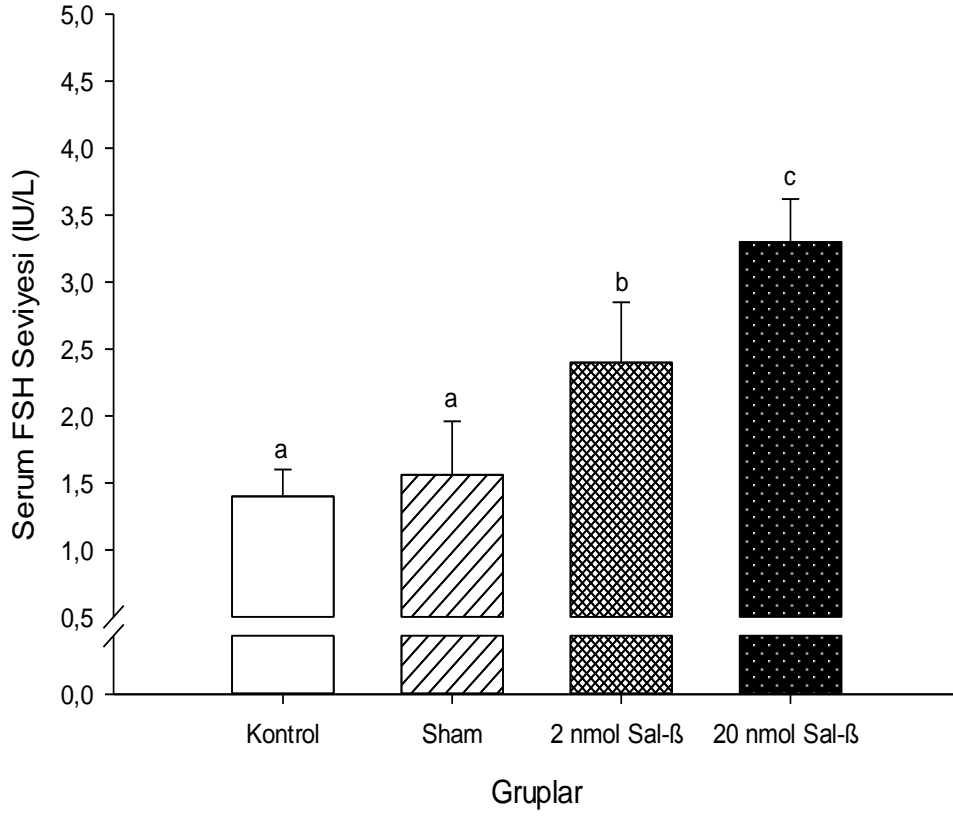
farklılık olmadığı görüldü. Öte yandan Sal- β uygulanan gruplardaki sıçanların serum LH seviyesinin kontrol ve sham grubuna kıyasla yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Salusin uygulanan gruplar bakımından, yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, meydana gelen etkinin doz bağımlı olmadığı görüldü.



Şekil 4.2. İcv Sal- β infüzyonunun serum LH seviyesi üzerindeki etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama standart \pm sapma olarak özetlendi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermekte olup, ^{a,b} $p<0.05$).

4.3. İcv Salusin- β İnfüzyonunun Serum FSH Seviyesi Üzerindeki Etkileri

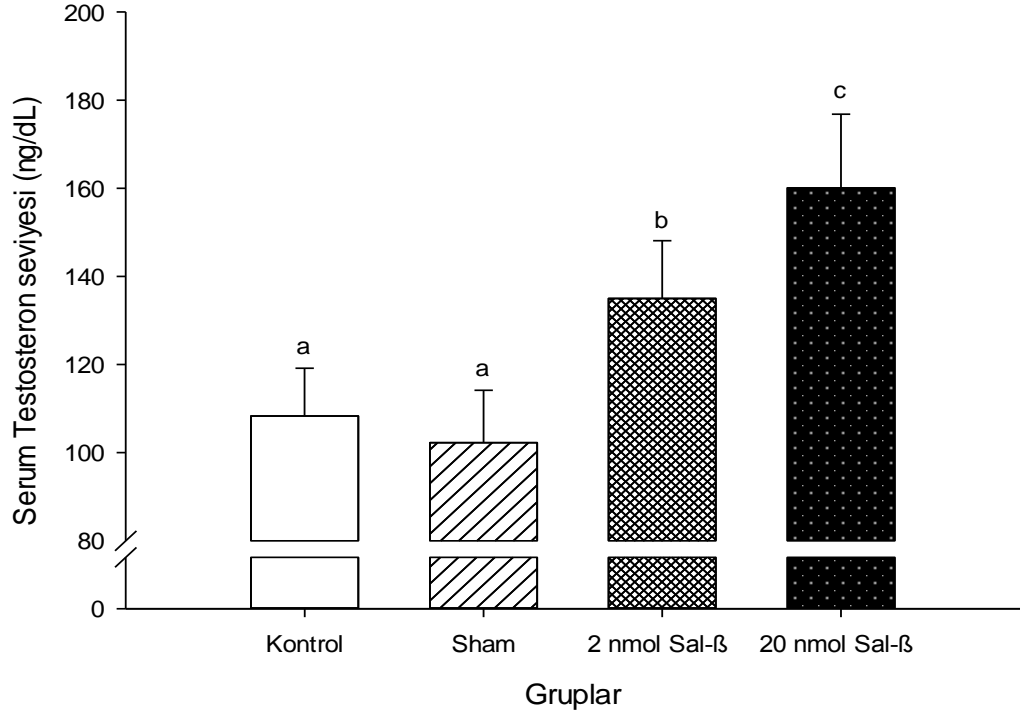
Kontrol, sham ve Sal- β (2 ve 20 nmol) uygulanan gruplardaki sıçanların serum FSH düzeyleri Şekil 4.3'de sunulmuştur. Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol ve sham grubundaki sıçanların serum FSH düzeylerinin benzer olduğu ancak Sal- β uygulanan grupların kontrol ve sham grubuna kıyasla serum FSH seviyesinin yüksek olduğu görüldü ($p<0.05$). Meydana gelen bu artışın yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda doz bağımlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.3. İcv Sal-β infüzyonunun serum FSH seviyesi üzerindeki etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama standart ± sapma olarak özetlendi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermekte olup, ^{a,b,c}p<0.05).

4.4. İcv Salusin-β İnfüzyonunun Serum Testosteron Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Deney gruplarının serum testosteron seviyelerinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Gruplar serum testosteron seviyesi açısından karşılaştırıldığında Sal-β uygulamasının doz bağımlı olarak artışa neden olduğu (p<0.05), kontrol ve sham grubunda ise testosteron seviyesinin benzer düzeyde olduğu görüldü.

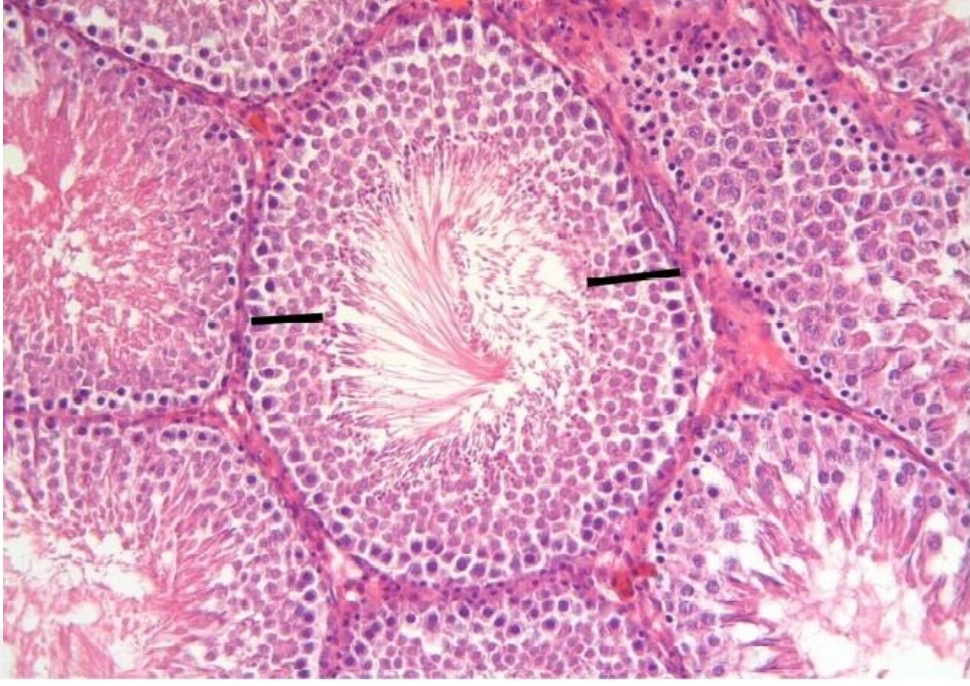


Şekil 4.4. İcv Sal-β infüzyonunun serum Testosteron seviyesi üzerindeki etkisi (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama standart ± sapma olarak özetlendi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermekte olup, ^{a,b,c}p<0.05).

4.5. Histolojik İnceleme

4.5.1. İcv Salusin-β Uygulamasının Seminifer Tübül Yapısı ve Çapı Üzerindeki Etkileri

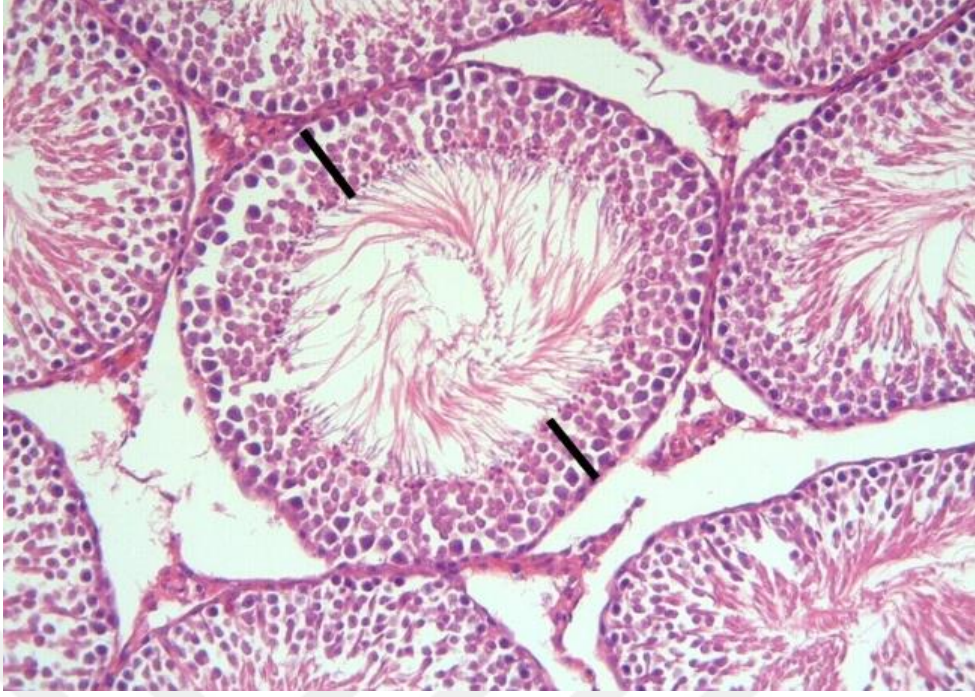
Sal-β'nin farklı iki dozunun seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlıkları açısından yapılan histolojik incelemeler sonucunda, kontrol (Şekil 4.5), sham (Şekil 4.6) 2 nmol Sal-β (Şekil 4.7) ve 20 nmol Sal-β (Şekil 4.8) olmak üzere tüm gruplarda seminifer tübüllerin bazal laminadan lümene doğru uzanan normal histolojik görünümüne sahip germinal epitelden oluştuğu görülmüştür. Germinal epitelde sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreler belirgin olarak ayırt edilmekteydi.



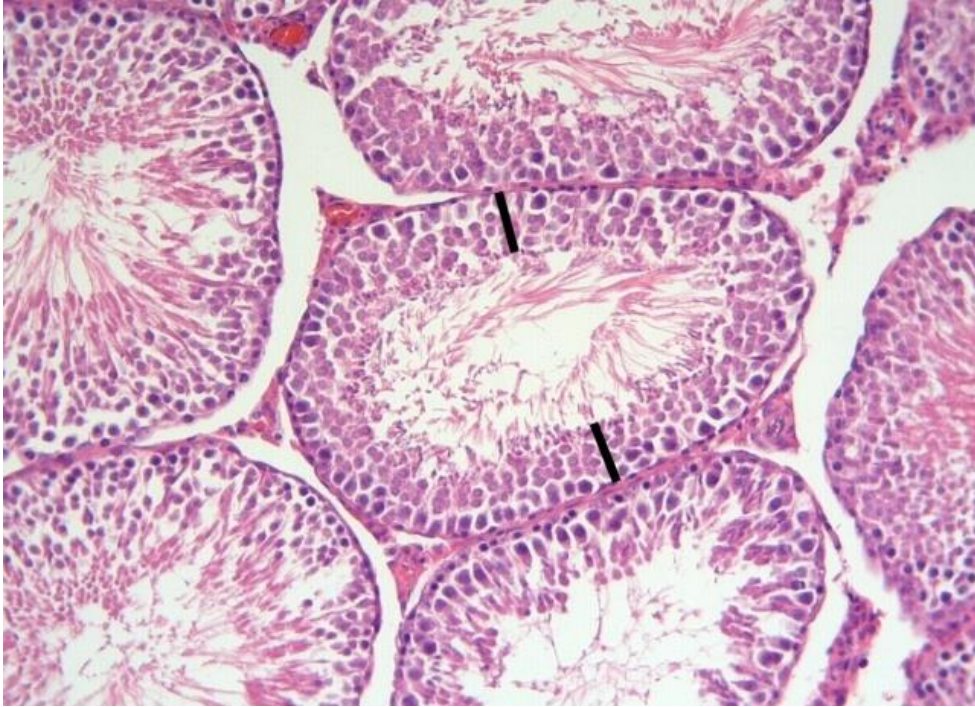
Şekil 4.5. Kontrol gurubundaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (Siyah çizgiler germinal epiteli gösteriyor. H-; 20x).



Şekil 4.6. Sham gurubundaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (Siyah çizgiler germinal epiteli gösteriyor. H-; 20x)



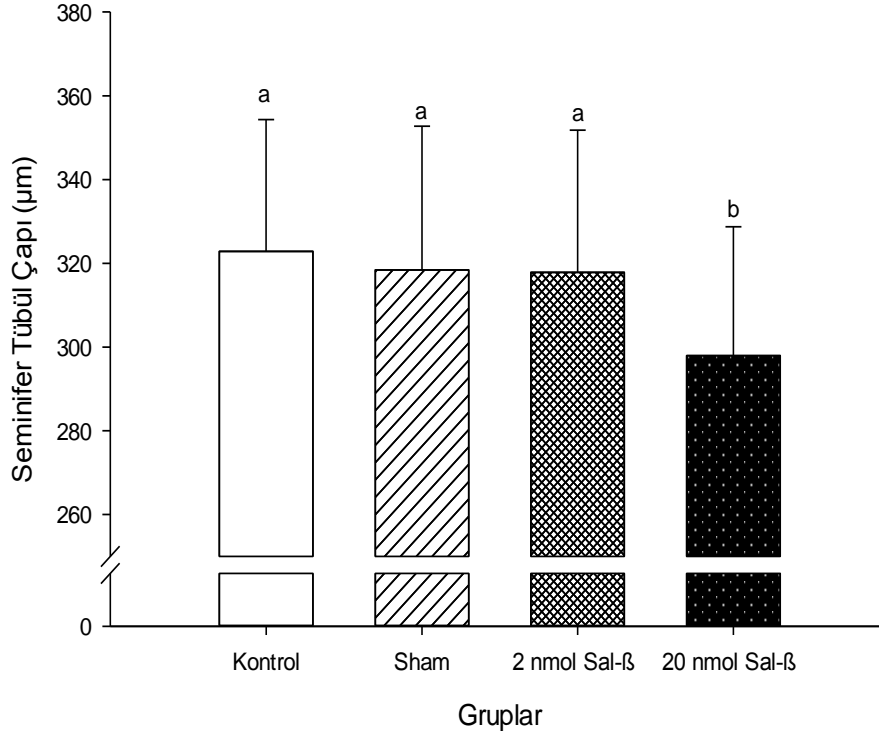
Şekil 4.7. Düşük doz (2 nmol) Sal- β uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (Siyah çizgiler germinal epiteli gösteriyor. H-; 20x).



Şekil 4.8. Yüksek doz (20 nmol) Sal- β uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (Siyah çizgiler germinal epiteli gösteriyor H-; 20x).

Sal- β uygulamasının seminifer tübül çapı üzerine etkisi Şekil 4.9'da sunulmuştur. Elde edilen veriler sonucunda ortalama seminifer tübül çapı kontrol ve sham

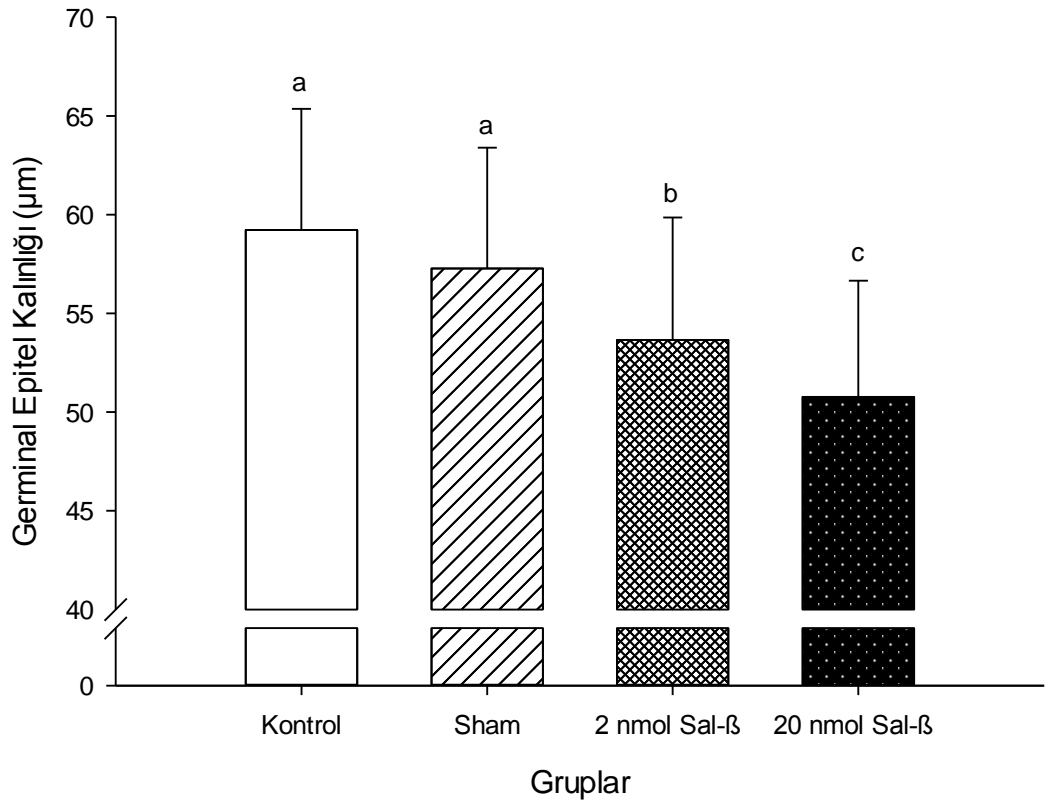
gruplarında istatistiksel olarak benzer bulundu. Sal- β uygulanan gruplarda (2 nmol hariç) testis dokusunda seminifer tübül çapının istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.9. Sal- β uygulamasının seminifer tübül çapı üzerine etkisi. (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama standart \pm sapma olarak özetlendi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermekte olup, ^{a,b} $p<0.05$).

4.5.2. İcv Salusin- β Uygulamasının Germinal Epitel Kalınlığı Üzerindeki Etkileri

Sal- β uygulanan canlıların germinal epitel kalınlığında meydana gelen değişiklikler Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Kontrol ve sham gruplarının germinal epitel kalınlığına bakıldığında istatistiksel olarak bir fark tespit edilemedi ($p<0.05$). 2 ve 20 nmol olmak üzere farklı iki dozda Sal- β uygulamasının germinal epitel üzerine etkilerine bakıldığında ise 2 nmol ve 20 nmol Sal- β infüzyonundan sonra her iki doz uygulanan canlıların germinal epitel kalınlığının kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). 2 nmol ve 20 nmol Sal- β uygulanmış canlılarda iki dozun kendi aralarındaki germinal epitel kalınlıkları karşılaştırıldığında ise 20 nmol Sal- β uygulanan gruptaki canlıların germinal epitel kalınlığında 2 nmollük doza göre anlamlı bir şekilde azalma meydana geldiği görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4.10. Sal-β uygulanan canlıların germinal epitel kalınlığında meydana gelen değişiklikler (Verilerin değerlendirilmesi Kruskal Wallis H testi kullanılarak yapıldı. Çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Nicel veriler ortalama standart \pm sapma olarak özetlendi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı göstermekte olup, $a,b,c p < 0.05$).

5. TARTIŞMA

5.1. Sal- β 'nin Serum LH, FSH, Testosteron Seviyeleri ile Semnifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığı Üzerine Etkileri

Üreme davranışları ve bu davranışların merkezi ve periferik kontrol mekanizmalarının bilinmesi nesillerin devamı için önem arz etmektedir. Üremenin kontrolünden sorumlu hormonal ağ, hipotalamus-hipofiz-gonadal eksen üzerinde etkileşim gösterir. Bu eksen GnRH sentezinin yapıldığı hipotalamus; LH ve FSH'nin sentezlendiği ön hipofiz; seks steroidleri ve diğer hormonların yapıldığı gonadlar olmak üzere üç büyük kompartmandan oluşmuştur (90). GnRH, hipotalamustan özellikle ARN, PVN, SON, MPN tan salınmaktadır. Sıçan, fare ve maymunlar üzerinde yapılan çalışmalarda hipotalamustan pulsatil GnRH salgısına, ön hipofizden pulsatil tarzda LH salgılanmasının eşlik ettiği gösterilmiştir (91). Ön hipofizin LH salgısı, testislerdeki Leydig hücreleri üzerinden testosteron salınımını gerçekleştirmektedir (97). Leydig hücrelerinden salınarak dolaşıma katılan testosteron negatif geri bildirim mekanizması ile GnRH salınımını durdurabilmektedir (98). GnRH etkisiyle ön hipofizde salınan bir diğer gonadotropin olan FSH'nin ise testislerdeki sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezi başlattığı bilinmektedir (99).

Salusinler 2003 yılında keşif edilmiş olup yapılan çalışmalar ile Sal- β 'nin, Sal- α 'dan daha etkin olduğu gösterilmiştir (1, 25). Erkek sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, PVN'de salusin inhibisyonun hipertansiyon, nörotransmitter ve sitokin onarımı ile kardiyak hipertrofi üzerine etkileri incelenmiş ve salusin- β 'nin PVN'deki nörotransmitterleri ve sitokinleri arttırdığı, böylece hipertansif tepkileri ve kardiyak hipertrofiyi azalttığı rapor edilmiştir (97). Merkezi alandaki Sal- β 'nin etkilerine yönelik bulguların elde edilmesi ile Sal- β 'nin merkezi alandaki rolleri üstlerine araştırmalar yoğunlaşmıştır. Yapılan bir başka çalışmada Sal- β 'nin traktus solitarii'ye mikroenjeksiyonun hipotansiyon ve bradikardi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (100). Diğer bir araştırmada sıçan hipertansiyon modelinde PVN'deki protein kinaz C-NAD(P)H oksidaz-süperoksit anyon yolağına Sal- β 'nin sempatik uyarımının etkisi ile arginin vazopressin salınımını indüklediği görülmüştür (101). Sal- β 'nin hipotalamus, medianeminens, hipofiz ve testiste varlığının tespit edilmiş ve sistemik dolaşım yoluyla arka hipofiz ve hipotalamus nöronları üzerinde

baskı oluşturduğu ve merkezi alanlarda önemli fizyolojik roller üstlendiği belirlenmiştir (6, 12, 101). Bu bulgular peptidin, üreme aksı ile ilişkili fonksiyonlar üzerinde de rollerinin olabileceğini ve bazı reproduktif süreçlerin Sal- β aracılığıyla düzenlenebileceğini düşündürmektedir (102). Bu çalışmada *Wistar Albino* cinsi sıçanlar kullanılmış olup, kontrol gurubuna herhangi bir işlem yapılmazken, sham gurubuna 7 gün boyunca icv yöntemiyle yBOS, deney gruplarına ise iki farklı konsantrasyonda (2 ve 20 nmol) Sal- β infüzyonu yapılarak GnRH mRNA ve serum LH, FSH, testosteron seviyeleri ve testis morfolojisi araştırıldı. Uygulanan Sal- β 'nin sıçan GnRH mRNA seviyesini arttırdığı görüldü ($p < 0.05$). Pulsatil tarzda salınım gösteren GnRH'da meydana gelen artış tarzında ki devamlı bir etkinin Sal- β 'nin uygulama şeklinden (infüzyon) kaynaklandığını düşünmekteyiz. Peptidin uygulanması için tercih edilen infüzyon yöntemi sayesinde kararlı durum konsantrasyonuna ulaşabildiği görülmekte ve doz flüktüsyonlarından (dalgalanma) kaçınılarak pulsatil olarak salgılanan GnRH'da uzun süreli ateşleme meydana geldiği düşünülmektedir. Sürekli bir infüzyon modeliyle (10 μ l/saat/7gün süresince günlük 2 ve 20 nmol Sal- β uygulaması) etkinin devamlılığını sağlanmıştır. Pulsatil tarzda salınım gösteren Hipofiz bezinden GnRH salgısındaki artışa ve azalışlara anlık olarak, ön hipofizden LH salgısı ile fizyolojik cevabı vermektedir. Yapılan LH analizlerinde 2 ve 20 nmol Sal- β uygulanan gruplarda GnRH salgısına bağlı olarak LH seviyesinin de kontrol ve sham gruplarına karşı yüksek olduğu görüldü. GnRH salgısında LH kadar anlık bir cevap oluşturmasa dahi saatler içerisinde GnRH değişimine bağlı olarak FSH'da GnRH salgısına cevap vermektedir. Sal- β uygulanan gruplarda artan GnRH salgısına bağlı olarak dolaşımda ki FSH salgısında da önemli düzeyde artma (doz bağımlı) olduğu belirlendi. Sal- β uygulamasına bağlı olarak GnRH'da doz bağımlı bir etki meydana gelmemişken, FSH seviyesinde doz bağımlı bir etkinin meydana gelmesinin altında yatan ana sebepler arasında, FSH'nın GnRH salgısından birkaç saat sonra pulsa cevap vermesinden (63) kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Öte yandan yapılan serum testosteron seviyesini belirlemeye yönelik ELISA analizleri sonucunda Sal- β uygulamasının yapıldığı gruplarda serum testosteron seviyesinin de arttığı görüldü. Bütün bu mekanizma hep birlikte değerlendirildiğinde merkezi olarak infüzyon şeklinde uygulanan Sal- β 'nin, hipotalamusta ki GnRH seviyesini arttırarak periferde üreme davranışında etkili olan LH, FSH ve testosteron hormon seviyelerini de arttırdığını düşünmekteyiz. Mevcut literatür bilgileri dikkate alındığında Sal- β 'nin üreme sisteminin fizyolojik mekanizmasını aydınlatmaya yönelik herhangi bir araştırma olmayıp çalışma bulgularımız bu alanda ilk olma özelliğindedir.

Çalışma sonunda yapılan histoloji analizler sonucunda Sal- β infüzyonunun testis dokusunda seminifer tübül çapını ve germinal epitelde kalınlığında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Mevcut literatürde seminifer tübül ve epitel kalınlığı üzerine çeşitli maddelerin (hormonal ve çevresel) etkinliği araştırılmış olup yapılan çalışmalar birbirleri ile kısmen çelişmektedir. Yapılan bir araştırma ile serum testosteron, FSH ve LH seviyelerinde meydana gelen azalmanın seminifer tübül epitel kalınlığında azalmaya neden olduğu rapor edilirken (103), bir başka çalışmada testosteron seviyesindeki artışın seminifer tübül çapında azalmalara neden olduğu rapor edilmiştir (104). Çalışmaların hepsinde hormonal artış ya da azalışla seminifer tübül çapı arasında tam bir birliktelik olmadığı görülmekte ve bu durum literatürde hormonal etkiler dışında çevresel farklı etkenlerinde rol alabileceğini ileri sürmektedir. Bizim çalışmamızda Sal- β uygulamasına bağlı olarak artan LH, FSH ve testosteron seviyesine rağmen germinal epitel kalınlığı ve seminifer tübül çapında meydana gelen azalmanın belki de üreme hormonları üzerinden gerçekleşmediği, Sal- β 'nin direkt testisler üzerindeki etkisinden kaynaklanabileceği veya Sal- β uygulamasından sonra salgılanan LH, FSH ve testosteron miktarlarının artışı neticesinde testisler üzerindeki bir negatif geri bildirim mekanizmasının etkisi ile gerçekleşebileceğini bize düşündürmektedir.

Yaptığımız çalışma Sal- β 'nin moleküler, histolojik ve hormonal olarak üreme davranışının fizyolojik mekanizması üzerindeki etkilerini kısmen açıklamaya yönelik bu alanda yapılan ilk çalışmalardan biri olup, fizyolojik mekanizmaların aydınlatılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu çok açıktır. Çalışmamız yapılacak olan ileri ki çalışmalara ancak temel oluşturabilecek niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde özellikle infertilite prevalansı ve insidansında ciddi artışlar olduğu rapor edilmekte ve hastalığın tedavisine yönelik birçok yeni hormon, ajan ve ilaç geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yaptığımız çalışma Sal- β 'nin üreme sisteminin fizyolojik mekanizmasında rol alan endokrinolojik faktörleri arttırdığını göstermektedir. Üreme davranışı üzerinde Sal- β 'nin üstlendiği pozitif etkilerin mekanizmasının açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Mekanizmanın tam olarak açıklanması durumunda Sal- β belki de infertilite ile mücadeleye yeni bir bakış açısı kazandıracaktır. Özellikle sperm morfolojisi, sayısı ve hareket yeteneği üzerinde Sal- β 'nin ne gibi roller üstleneceği merak konusudur. Tüm bunların dışında Sal- β 'nin dişi üreme sistemi üzerindeki etkileri bilinmemekte ve muhtemel etkiler halen gizemini korumaktadır. Bu alanda da detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Shichiri M, Ishimaru S, Ota T, Nishikawa T, Isogai T, Hirata Y. Salusins newly identified bioactive peptites with hemodynamic and mitogenic activities. *Nat Med* 2003; 9: 1166–72.
2. Sato K, Koyama T, Tateno T, Hirata Y, Shichiri M. Presence of immunoreactive salusin- α in human serum and urine. *Peptites* 2006; 27: 2561-6.
3. Sato K, Watanabe T, Suguro T, Koyama T, Shichiri M. Serum levels and urinary excretion of salusin- α in renal insufficiency. *Regul. Pept* 2010; 162: 129-32.
4. Izumiyama H, Tanaka H, Egi K, Sunamori M, Hirata Y, Shichiri M. Synthetics salusins as cardiac depressors in rat. *Hypertension* 2005; 45: 419-25.
5. Watanabe T, Suguro T, Sato K, Koyama T, Nagashima M, kodate S, Hirano T, Adachi M, shichiri M, Miyazaki A. Serum salusin-alpha levels are decreased and correlated negatively with carotid atherosclerosis in essential hypertensive patients. *Hypertens Res* 2008; 31: 463-8.
6. Aydın S, Eren MN, Aydın S. Kardiyovaskuler sistemde salusin α ve β 'nin fizyolojisi ve klinik rolü. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2014; 26: 33-38.
7. Chen WW, Sun HJ, Zhang F, Zhou YB, Xiong XQ, Wang JJ, Zhu GQ. Salusin-b in paraventricular nucleus increases blood pressure and sympathetic outflow via vasopressin in hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2013; 98: 344–51.
8. Suzuki N, Shichiri M, Akashi, T, Sato K. Systemic distribution of salusin expression in the rat. *Hypertens Res* 2007; 30: 1255-62.
9. Sato K, Fujimoto K, Koyama T, Shichiri M. Salusin-beta from human monocytes/macrophages. *Regul Pept* 2010; 162: 68-72.
10. Nakayama C, Shichiri M, Sato K, Hirata Y. Expression of prosalusin in human neuroblastoma cells. *Peptites* 2009; 30: 1362-7.
11. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science United States of America*, McGraw-Hill Compenies, 2000.
12. Saito T, Dayanithi G, Saito J, Onaka T, Urabe T, Watanabe TX, Hashimoto H, Yokoyama T, Fujihara H, Yokota A, Nishizawa S, Hirata Y, Ueta Y. Chronic

- osmotic stimuli increase salusin-beta-like immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system: Possible involvement of salusin-beta on $[Ca^{2+}]_i$ increase and neurohypophyseal hormone release from the axon terminals. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 207-19.
13. Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982; 111 (5): 1737-9.
 14. Foresta C, Bordon P, Rossato M, Mioni R, Veldhuis J. D. Specific Linkages Among Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone, and Testosterone Release in the Peripheral Blood and Human Spermatic Vein: Evidence for Both Positive (Feed-Forward) and Negative (Feedback) Within-Axis Regulation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82 (9): 3040-6.
 15. Bergendahl M, Evan W, Veldhuis J. Current concepts on ultradian rhythms of luteinizing hormone secretion in the human. *Human Reproduction Update* 1996; 2 (6): 507-18.
 16. Li HB, Qin DN, Suo YP, Guo J, Su Q, Miao YW, Sun WY, Yi QY, Cui W, Cheng K, Zhu GQ, Kang YM. Blockade of salusin- β in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in salt-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015; 66: 323-31.
 17. Lu Y, Wu YS, Chen DS, Wang MM, Wang WZ, Yuan WJ. Microinjection of salusin-beta into the nucleus tractus solitarii inhibits cardiovascular function by suppressing presympathetic neurons in rostral ventrolateral medulla in rats. *Physiol Res* 2015; 64: 161-71.
 18. Sun HJ, Zhang LL, Fan ZD, Chen D, Zhang L, Gao XY, Kang YM, Zhu GQ. Superoxide anions involved in sympathoexcitation and pressor effects of salusin- β in paraventricular nucleus in hypertensive rats. *Acta Pyhsiol (Oxf)* 2014; 210: 534-45.
 19. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Cakmak T, Albayrak S, Gungor S, Colakoglu N, Ozercan İ. H. 2014. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. *Peptides*, 61 (0), 130-6.

20. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15: 623-35.
21. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy KL, D'Souza UJ. An organophosphateinsecticide Methyl Parathion (O-O- Dimethyl O-4- Nitrophenyl Phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubuler atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *The Journal of Toxicological Sciences* 2006; 31: 177-89.
22. Watanabe T, Nishio K, Kanome T, Matsuyama TA, Koba S, Sakai T. Impact of salusin-alpha and -beta on human macrophage foam cell formation and coronary atherosclerosis. *Circulation* 2008; 117: 638-48.
23. Sipahi S, Genc AB, Acıkgöz SB, Yıldırım M, Aksoy YE, Vatan MB, Dheir H, Altindis M, Relationship of salusin-alpha and salusin-beta levels with atherosclerosis in patients undergoing haemodialysis. *Singapore Med J* 2018.
24. Yılmaz M, Ateşçelik M, Göktetin MC, Yıldız M, Gürger M, Kobar MA, İlhan N. ST-Segment Yükselmesi Miyokard İnfarktüsünde Serum Salusin Düzeyleri. *Clin Lab* 2016; 62(9): 1717-23.
25. Cakir M, Duzova H, Taslidere A, Orhan G, Ozyalin F. Protective effects of salusin- α and salusin- β on renal ischemia/reperfusion damage and their levels in ischemic acute renal failure. *Biotech Histochem* 2017; 92: 122-33.
26. Kimoto S, Sato K, Watanabe T, Suguro T, Koyama T, Shichiri M. Serum levels and urinary excretion of salusin-alpha in renal insufficiency. *Regul Pept* 2010, 162(1-3): 129-32.
27. Çakır M, Sabah Ö, Saçmacı H. Increased level of plasma salusin- α and salusin- β in patients with multiple sclerosis. *Mult Skler Relat Disord* 2019; 30: 76-80.
28. Celik E, Celik Ö, Yılmaz E, Turcuoglu I, Karaer A, Turhan U, Aydın S. Association of low maternal levels of salusins with gestational diabetes mellitus and with small-for-gestational-age fetuses. *Eur j Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 167: 29-33.
29. Aydın S, Çelik O, Ulaş M, Yılmaz M, Kalaycı M, Kuloğlu T, Çatak Z, Kumru S. Gestasyonel diabetes mellitusu olan veya olmayan emziren kadınların plazma ve

- sütlerinde preptin, salusinler ve hepidinlerin konsantrasyonları. *J. Eptepler* 2013; 49: 123-30.
30. Şahin S, Aydın S. Fruktozun neden olduğu metabolik sendromlu sıçanlarda salusin- a ve salusin- serum konsantrasyonu ve böbrek ekspresyonu. *Epub* 2012; 88 (3-4): 153-60.
31. Aydın S, Aydın S. Salusin -metabolik sendrom olan ve olmayan kalpte ve aortta alfa ve beta ekspresyonu. *Biotech Histochem* 2014, 89 (2): 98-103.
32. Qian K, Feng L, Sun Y, Xiong B, Ding Y, Han P, Chen H, Chen X, Du L, Wang Y. Overexpression of Salusin- α Inhibits Vascular Intimal Hyperplasia in an Atherosclerotic Rabbit Model. *Biomed Res Int* 2018; 10: 1155.
33. Izumiyama H, Tanaka H, Egi K, Sunamori M. Synthetic salusins as cardiac depressors in rat. *Hypertensin* 2005; 45: 419–25.
34. Sato K, Sato T, Susumu T, Koyama T, Shichiri M. Presence of immunoreactive salusin- β in human plasma and urine. *Regul Pept* 2009; 158: 63-7.
35. Aydın S. Kardiyopulmoner Bypassın Apelin ve Salusin Ekspresyonlarına Etkileri ve Salusin Aort, Safen, Ven ve Arteryel Greftlerde Lokal Olarak Sentezlenip Sentezlenmediğinin Araştırılması. Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi, Diyarbakır: Dicle Üniversitesi, 2011.
36. Aydın S, Eren MN, Aydın S, Özercan IH, Dagli AF. The bioactive peptides salusins and apelin-36 are produced in human arterial and venous tissues and the changes of their levels during cardiopulmonary bypass. *Peptides* 2012; 37: 233-9.
37. Aydın S, Eren MN, Aydın S. Kardiyovasküler sistemde salusin α ve β ' nin fizyolojisi ve klinik rolü. *Türkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences* 2014; 26: 33-8.
38. Takenoya F, Hori T, Kageyama H, Funahashi H, Tekeuchi M. Coexistence of salusin and vasopressin in the rat hypothalamo-hypophyseal system. *Neurosci Lett* 2005; 385: 110–3.
39. Anaspec.<http://www.Anaspec.com/products/product.asp?id=38604&productid=20437>, 23.02.2012.

40. Catak Z. Fruktozla Metabolik Sendrom Oluşturulmuş Ratlarda Serum ve Testiküler Ghrelin, Obestatin ve Nesfatin-1 Ekspresyonlarının İncelenmesi. Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2012.
41. Yu F, Zhao J, Yang J, Gen B. Salusins promote cardiomyocyte growth but does not affect cardiac function in rats. *Regul Pept* 2004; 122:191-7.
42. Xiao HY, Li L, Yan-Xia P. Salusins protect neonatal rat cardiomyocytes from serum deprivation-induced cell death through upregulation of GRP78. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 48: 41– 6.
43. Reaux A, De Mota, N Skultetyova, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Liorens-Cortex C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its reseptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001; 77 1085-96.
44. Miyazaki A, Sakashita N, Lee O, Takahashi K, Horiuchi S, Hakamata H, Morganelli PM, Chang CC, Chang TY. Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerotic lesions and cultured human monocytes-macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1568 –74.
45. Schmitz G, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Klucken J, Orso E, Bodzioch M, Büchler C, Drobnik W. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in macrophages: a dual function in inflammation and lipid metabolism? *Pathobiology* 1999; 67: 236 –40.
46. Shichiri M, Ishimaru S, Ota T. Salusins: newly identified bioactive peptites with hemodynamic and mitogenic activities. *Nat Med* 2003; 9: 1166–72.
47. Tanyeli A, Eraslan B, Polat E, Bal T. Protective effect of salusin- α and salusin- β against ethanol-induced gastric ulcer in rats. *J Basic Clin Pyhsiol Pharmacol* 2017; 28: 623-30.
48. Kimura M, Shindo M, Moriizumi T. Salusin- β , an antimicrobially active peptide against Gram-positive bacteria. *Chem Pharm Bull* 2014; 62: 586-90.
49. Celik Ö, Yılmaz E, Celik N, Minareci Y, Turcuoglu I, Simsek Y, Celik E, Karaer A, Aydın S. Salusins, newly identified regulators of hemodynamics and mitogenesis, increase in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 83-6.

50. Chang Y, Yoo J, Kim H, Park HJ, Jeon S, Kim J. Salusin- β mediate neuroprotective effects for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 503: 1428-33.
51. Sun HJ, Chen D, Wang PY, Wan MY, Zhang CX, Zhang ZX, Lin W, Zhang F. Salusin- β Is Involved in Diabetes Mellitus-Induced Endothelial Dysfunction via Degradation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 690: 5217.
52. Zhang Q, Chen WM, Zhang XX, Zhang HX, Wang HC, Zheng FY, Zhu FF. Overexpression of salusin- β is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2017; 37: 1826-32.
53. Suzuki- Kemuriyama N, Nakano- Tateno T, Tani Y, Hirata Y, Shichiri M. Salusin- β as a powerful endogenous antidipsogenic neuropeptide. *Sci Rep* 2016.
54. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*. United States of America, McGraw- Hill Companies, 2013.
55. Cai D, Liu T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1243: E1-39.
56. Prior JL, Head GA, Armitage JA. Experimental Models of obesity and high fat diet during pregnancy and programmed obesity in offspring, obesity before birth. *Lustig H R* 2011; 241-259.
57. Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Review* 2005; 85: 1131-58.
58. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell Review* 2007; 129: 251-62.
59. Saito M, Kondo A, Kato T, Yamada Y. Frequency-volume charts: comparison of frequency between elderly and adult patients. *British Journal of Urology International* 1993; 72: 38-41.
60. Matthiesen TB, Rittig S, Nørgaard JP, Pedersen EB, Durhuus JC. Nocturnal polyuria and natriuresis in male patients with nocturia and lower urinary tract symptoms. *Journal of Urology* 1996; 156: 1292-9.

61. Kikuchi Y. Participation of atrial natriuretic peptide (hANP) levels and arginine vasopressin (AVP) in aged persons with nocturia. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1995; 86: 1651-9.
62. Koch M, Horvath TL. Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 752-61.
63. Guton AC. *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2013.
64. O'Carroll AM, Lolait SJ, Harris LE, Pope GR. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *The Journal of endocrinology* 2013; 219: R13-35.
65. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*, 3. Baskı. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2001.
66. Reece WO. *Dukes Veteriner Fizyoloji*. Yıldız S (Çeviren). 12.Baskı, Malatya: Medipres Yayıncılık, 2004.
67. Molina EP. *Endocrine Physiology*. United States of America: McGraw-Hill Companies, 2004.
68. Rago R, Salacone P. Hypothalamus-hypophysis-testicle axis. *Journal of Andrological Sciences* 2008; 15: 13-7.
69. Zarek E, Cheah PS, Schwartz J, Thomas P. Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus. *Molecular and cellular endocrinology* 2010; 323: 115-23.
70. Caqueret A, Boucher F, Michaud JL. Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Developmental Biology* 2006; 298: 95-106.
71. Knobil E. The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:1721-7.
72. Levine JE, Pau KYF, Ramirez VD, Jackson GL. Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 1982; 111: 1449-55.
73. Urbanski HF, Ojeda SR. Activation of luteinizing hormone-releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology* 1987; 46: 273-6.

74. Yingdong Ni, Yuchuan Z, Lizhi L, Roland G, Ruqian Z. Developmental changes of FSH-R, LH-R and GnRH-I expression in the ovary of prepubertal ducks (*Anas platyrhynchos*). *Anim Reprod Sci* 2007; 100: 318–28.
75. Perez-Castro C, Renner U, Haedo M R, Stalla GK, Arzt E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. *Physiological reviews* 2012, 92: 1-38.
76. Molina, P E. *Endocrine Physiology*. United States of Ameica, McGraw-Hill Companies, 2004.
77. Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg DG, MacLean A, Barrett P. The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 1996; 137: 4018-26.
78. Lamacz M, Tonon MC, Louiset E, Cazin L, Vaudry H. The intermediate lobe of the pituitary, model of neuroendocrine communication. *Archives internationales de physiologie, de biochimie et de biophysique* 1991; 99: 205-19.
79. Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2013.
80. McLaughlin D, Stamford J, White D. *İnsan Fizyolojisi*. Abdurrahman Aktümsek (Çeviren). 1. Baskı, İstanbul: Nobel, 2010.
81. Karsch FJ, Moenter SM, Caraty A. The neuroendocrin signal for ovulation. *Anim Reprod Sci* 1992; 28: 329–41.
82. Ellis GB, Desjardins C, Fraser HM. Control of pulsatile LH release in male rats. *Neuroendocrinology* 1983; 37: 177–83.
83. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlası: Palme yayıncılık*, 2013: 784-802.
84. Ayla Öber. *GTİ Histoloji*. Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2010: 244-47.
85. Jungueria CL. *Temel Histoloji*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2010: 500.
86. Tekelioğlu M. *Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişimi*. Ankara, Antıp A.Ş, 2010: 318.
87. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: An Ġntroduction To Pathology*, 2010.
88. Mesccher AL. *Junqueira''s Basic Histology Text and Atlas*, 2013: 429-48.

89. Mitamura R, Yano K, Suzuki N, Ito Y, Makita Y, Okuno A. Diurnal rhythms of luteinizing hormone, folliclestimulating hormone, and testosterone secretion before the onset of male puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 84: 29-37.
90. Mitamura R, Yano K, Suzuki N, Ito Y, Makita Y, Okuno A. Diurnal rhythms of luteinizing hormone, folliclestimulatinghormone, testosterone, and estradiol secretion before the onset of female puberty in short children. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1074-80.
91. Öcal G. Pubertal Fizyoloji. Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S (Editörler), *Pediatric Endocrinoloji*. 1. Basım, Ankara, Pediatric Endocrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları, 2010: 137-53.
92. Alzet. http://www.Alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html
11.03.2011.
93. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 7th Edition. London, UK, Academic Press, 2013.
94. Bancroft JD, Stevers A. Theory and Practice of Histological Techniques. *Chrchill Livingstone*, 2010.
95. Colledge, WH, Mei H, d'Anglemont de Tassigny X. Mouse models to study the central regulation of puberty. *Molecular and cellular endocrinology* 2010, 324 (1-2): 12-20.
96. Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982; 111 (5): 1737-9.
97. Li HB, Qin DN, Suo YP, Guo J, Su Q, Miao YW, Sun WY, Yi QY, Cui W, Cheng K, Zhu GQ, Kang YM. Blockade of salusin- β in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in salt-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015; 66: 323-31.
98. Foresta C, Bordon P, Rossato M, Mioni R, Veldhuis J. D. Specific Linkages Among Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone, and Testosterone Release in the Peripheral Blood and Human Spermatic Vein: Evidence for Both Positive (Feed-Forward) and Negative (Feedback) Within-Axis Regulation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82 (9): 3040-6.

99. Bergendahl M, Evan W, Veldhuis J. Current concepts on ultradian rhythms of luteinizing hormone secretion in the human. *Human Reproduction Update* 1996; 2 (6): 507-18.
100. Lu Y, Wu YS, Chen DS, Wang MM, Wang WZ, Yuan WJ. Microinjection of salusin-beta into the nucleus tractus solitarius inhibits cardiovascular function by suppressing presympathetic neurons in rostral ventrolateral medulla in rats. *Physiol Res* 2015; 64: 161-71.
101. Sun HJ, Zhang LL, Fan ZD, Chen D, Zhang L, Gao XY, Kang YM, Zhu GQ. Superoxide anions involved in sympathoexcitation and pressor effects of salusin- β in paraventricular nucleus in hypertensive rats. *Acta Pyhsiol (Oxf)* 2014; 210: 534-45.
102. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Cakmak, T, Albayrak S, Gungor S, Colakoglu N, Ozercan, İ. H. 2014. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. *Peptides*, 61: 130-6.
103. Kianifard D, Sadrkhanlou RA, Hasanzadeh S. The ultrastructural changes of the sertoli and leydig cells following streptozotocin induced diabetes. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15: 623-35.
104. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy KL, D'Souza UJ. An organophosphate insecticide Methyl Parathion (O-O- Dimethyl O-4- Nitrophenyl Phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *The Journal of Toxicological Sciences* 2006; 31: 177-89.

EKLER

EK 1. Özgeçmiş

Ad: İlker
Soyad: DEMİR
Doğum Yeri: Battalgazi/MALATYA
Doğum Tarihi: 20.06.1984
Adres İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi
Cep Telefonu (506) 701 75 83
Yabancı Dil: İngilizce
E-Posta Adresi fztilkerdemir@gmail.com

Eğitim Durumu

Lisans : Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Kemal Demir Fizyoterapi ve
Rehabilitasyon Yüksek Okulu (2008-
2012)

Y. Lisans : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji A.D. (2016-2019)

Y.Lisans Tezi : Sıçanlarda İntraserebroventriküler
Salusin- β İnfüzyonunun Hipotalamus-
Hipofiz-Testiküler Aks Üzerindeki
Etkileri

Y.L Tez Danışmanı Doç. Dr. Suat TEKİN

EK 2. Etik Kurulu



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 02-11-2017
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2017/A-55
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : *Wistar Albino*
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 250-270 g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Suat TEKİN'in yürütücüsü olduğu "Sıçanlarda İntraserebroventriküler Salusin- β İnfüzyonunun Hipotalamus- Hipofiz- Testiküler Aks Üzerindeki Etkileri." isimli 2017/A-55 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılar a ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	<i>Katılmadı</i> Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
 Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye	 Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye	 Doç. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
 Vet.Hek. Özge ÖZYALIN Üye	<i>Katılmadı</i> Akin ÖZ Sivil Üye	<i>Katılmadı</i> Dr. Mehmet DENİZ Sivil Üye