

SUAT TEKİN

YÜKSEK LİSANS 2011

TFİZ Y-7

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

**ERKEK SIÇANLARDA
İNTRASEREBROVENTRİKÜLER
APELİN UYGULAMASININ
HİPOTALAMUS- HİPOFİZ-GONADAL
EKSEN ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Suat TEKİN
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman SANDAL**

MALATYA- 2011

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

**ERKEK SIÇANLARDA
İNTRASEREBROVENTRİKÜLER APELİN
UYGULAMASININ HİPOTALAMUS –
HİPOFİZ - GONADAL EKSEN ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

SUAT TEKİN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Süleyman SANDAL

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2010/140 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. M.Hanifi EMRE



Üye

Prof.Dr. Sedat YILDIZ



Danışman

Doç.Dr. Süleyman SANDAL



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜRLER

2010-140 nolu yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Süleyman SANDAL ve ailesine, ELISA analizlerinde katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sedat YILDIZ başta olmak üzere bölümümüz tüm öğretim üyelerine, tez araştırmamın yapımı ve yazımı sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Nigar VARDI'ya, Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr. Ali BEYTUR'a, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim elemanı Sayın Arş.Grv. Tuba TAPAN'a, tez araştırmamın deneyleri sırasında katkı ve yardımlarını esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve YÜDETAM Müdürü Sayın Prof.Dr. Bayram YILMAZ'a, çalışmamız sırasında Yeditepe Üniversitesi Beyin Araştırma Merkezinin tüm imkanlarını bize sunan Sayın Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ'a, Sayın Dr. Burcu ŞEKER'e, Sayın Arş. Grv. Taha KELEŞTİMUR'a, veteriner hekim Sayın Burcu ÇEVRELİ'ye,

Hayatım boyunca benden desteğini, sevgisini ve sabrını esirgemeyen aileme, tez çalışmalarım süresince gösterdiği anlayış ve desteğinden dolayı nişanlım Arş.Grv. Çiğdem Öz'e,

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Suat TEKİN

ÖZET

Apelin, G protein kenetli orfan apelin reseptörünün (APJ) endojen ligantıdır. APJ'nin sindirim sistemi, kalp ve adipoz doku gibi çeşitli dokularda dağılım gösterdiği bilinmektedir. APJ'nin hipotalamusta özellikle arkuat, supraoptik ve paraventriküler nükleus gibi hipotalamik alanlarda dağılım göstermesi gıda alımı ve su içme davranışının kontrolünde apelinin rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca testislerde de APJ'nin bulunması üreme sistemi üzerinde, apelinin etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir.

Bu çalışmada, kronik icv apelin-13 uygulamasının gıda ve su alımı, vücut ağırlığı, lüteinleştirici hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımı ve testosteron seviyeleri üzerine olan etkiler araştırıldı. Çalışmada 20 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney grubundaki sıçanlara 7 gün süreyle intraserebroventriküler (icv) olarak 1 ve 10 nmol apelin-13 (10 µl/h), kontrol grubundakilere ise aynı miktarda yapay beyin omurilik sıvısı infüze edildi. LH ve FSH salınımını belirlemek için 0, 15, 30, 45, 60, 75 ve 90. dakikalarda, testosteron analizi için ise sadece 90. dakikada kan örnekleri alındı.

Yüksek doz apelin-13 uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında su alımında artış ($p<0.05$) olduğu fakat düşük doz uygulanan grupta herhangi bir etki meydana gelmediği görüldü. Gıda alımı bakımından apelin-13 uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artışlar meydana geldi ancak bu artış sadece yüksek doz apelin-13 uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). 10 nmol apelin-13 infüzyonu yapılan grupta LH salınımının kontrole göre 30, 60, 75. dakikalarda anlamlı biçimde baskılandığı tespit edildi ($p<0.05$). FSH seviyelerinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Yüksek doz apelin-13 uygulanan grubun testosteron seviyesinin, kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0.05$).

Sonuçlarımız, apelin-13'ün beslenme davranışının, merkezi olarak düzenlenmesinde rol oynayabileceğini aynı zamanda da LH salınımını baskılayarak testosteron seviyesini azalttığını ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar, infertilite ve obezite tedavilerinde apelin reseptör antagonistlerinin faydalı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apelin, ozmotik icv infüzyon, gıda alımı, LH salınımı, sıçan

ABSTRACT

The Effects of Intracerebroventricularly Administered Apelin on Hypothalamus- Hypophysis- Gonadal Axes in Male Rats

Apelin is a novel bioactive peptide as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor, APJ, a receptor distributed in various tissues including the adipose tissue, heart and the gastrointestinal tract. Its receptors have also been identified in the testes, hypothalamic nuclei such as arcuate, supraoptic and paraventricular nuclei, implicating roles in reproduction, and in control of feeding and drinking behaviour.

Therefore, the present study was designed to investigate the effects of chronic central infusion of apelin-13 on food and water intake and body weight, luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and testosterone levels. Twenty Wistar-Albino male rats received continuous intracerebroventricular infusion via ALZET osmotic mini pumps filled artificial cerebrospinal fluid (CSF) or apelin-13 at concentrations of 1 and 10 nmol (10 μ l/h) for seven days. At the last 90 min of the infusion period, blood samples were collected at 15 min intervals (0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min.) for LH and FSH analyses. At the last sampling point (90 min), blood samples were analysed for testosterone levels.

Infusion of high dose apelin-13 resulted in significant increases in water intake compared with vehicle infused control group ($p < 0.05$), but the lower dose apelin-13 had no significant effect. Both doses of apelin-13 increased food intake but these alterations were only statistically significant in the high dose group ($p < 0.05$). Infusion of high dose apelin-13 significantly suppressed LH release compared with the vehicle values at 30, 60 and 75 min. ($p < 0.05$). However, FSH levels did not significantly differ among the groups. Plasma testosterone levels in high dose apelin-13 group were statistically lower than the control group ($p < 0.05$).

Our results suggest that apelin-13 may play a role in the central regulation both drinking and feeding behaviour and decreases testosterone release by suppressing LH secretion. Thus, antagonists of the apelin receptor may therefore be useful pharmaceuticals in the treatment of infertility and obesity.

Keywords: Apelin, osmotic icv infusion, food intake, LH release, rat

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Apelin	3
2.1.1. Apelinin biyokimyası	3
2.1.2. Apelin reseptörü	4
2.1.3. APJ' nin lokalizasyonu	6
2.1.4. Apelinin etkileri	8
2.1.4.1. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri	8
2.1.4.2. Sıvı elektrolit üzerine etkileri	9
2.1.4.3. Sindirim sistemi üzerine etkileri	10
2.1.4.4. Gıda alımı üzerine etkileri	10
2.1.4.5. Üreme sistemi üzerine etkileri	11
2.2. Hipotalamus	12
2.2.1. Hipotalamusun fonksiyonları	12
2.2.2. Hipotalamik nükleuslar	13
2.2.3. Hipotalamustan GnRH salgılanması	14
2.3. Hipofiz	15
2.3.1. Hipofiz bezinin fonksiyonları	15
2.3.2. Hipofiz bezinden LH salgılanması	17
2.3.3. Hipofiz bezinden FSH salgılanması	18
2.4. Testis	18

2.4.1.	Testisin fonksiyonları	18
2.4.2.	Leydig hücreleri	19
2.4.3.	Sertoli hücreleri	20
2.4.4.	Testosteron salgılanması	21
2.5.	Hipotalamus-hipofiz-testis eksenini	21
2.6.	Beslenmenin hipotalamik kontrolü	23
2.7.	Susamanın hipotalamik kontrolü	27
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1.	Deney hayvanları	29
3.2.	Hazırlık	30
3.2.1.	Yapay beyin omurilik sıvısı hazırlanması	30
3.2.2.	Ozmotik pompaların hazırlanması	31
3.2.3.	Beyin infüzyon kitinin hazırlanması	31
3.2.4.	Stereotaksi	33
3.2.4.1.	Koordinatların belirlenmesi	33
3.2.4.2.	Hayvanların hazırlanması	33
3.2.4.3.	Hayvanların stereotaksik cihaza yerleştirilmesi	34
3.3.	Hayvanların takibi ve deney protokollerinin uygulanması	36
3.4.	Analizlerin yapılması	40
3.4.1.	Plazma LH ve FSH seviyelerinin belirlenmesi	40
3.4.2.	Serum testosteron seviyesinin belirlenmesi	40
3.4.3.	Testis histolojisi	43
3.4.4.	İstatistiksel analiz	45
4.	BULGULAR	46
4.1.	Icv apelin-13 uygulanmasının vücut ağırlıkları üzerine etkileri	46
4.2.	Icv apelin-13 uygulanmasının gıda alımı üzerine etkileri	47
4.3.	Icv apelin-13 uygulanmasının su tüketimi üzerine etkileri	47
4.4.	Icv apelin-13 uygulanmasının serum testosteron seviyesi üzerine etkileri	48

4.5.	Icv apelin-13 uygulanmasının plazma LH salınımı üzerine etkileri	49
4.6.	Icv apelin-13 uygulanmasının plazma FSH salınımı üzerine etkileri	51
4.7.	Icv apelin-13 uygulanmasının testis ağırlıkları üzerine etkileri	52
4.8.	Histolojik inceleme	52
4.8.1.	Icv apelin-13 uygulanmasının seminifer tübüller üzerine etkileri	52
4.8.2.	Icv apelin-13 uygulanmasının Leydig hücreleri üzerine etkileri	55
5.	TARTIŞMA	59
5.1.	Apelin-13'ün vücut ağırlığı, gıda ve su tüketimi üzerine etkileri	59
5.2.	Apelin-13'ün plazma LH, FSH ve serum testosteron seviyesi üzerine etkileri	61
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	63
	KAYNAKLAR.....	64
	EK: Etik Kurul Onayı	76
	ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa	: Aminoasit
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ADH	: Antidiüretik hormon
A-P	: Anterior-Posterior
APJ	: Apelin reseptörü
ARN	: Arkuat nükleus
AT1R	: Anjiyotensin II tip 1
AV3V	: Üçüncü ventrikülün anteroventral bölgesi
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CRH	: Kortikotropin serbestleştirici hormon
EIA	: Enzyme immuno assay
ELISA	: Enzyme-linked immuno sorbent assay
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GH	: Büyüme hormonu
GHIH	: Büyüme hormonu baskılayıcı hormon
GHRH	: Büyüme hormonu serbestleştirici hormon
GnRH	: Gonadotropin serbestleştirici hormon
icv	: İntraserebroventriküler
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
LH	: Lüteinleştirici hormon
MN	: Magnosellüler nöron
MPN	: Medial preoptik nükleus
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NO	: Nitrik oksit
PIF	: Prolaktin baskılayıcı hormon
PN	: Parvosellüler nöron
PVN	: Paraventriküler nükleus
SF	: Serum fizyolojik

SON : Supraoptik nükleus
TRH : Tirotropin serbestleştirici hormon
TSH : Troid uyarıcı hormon

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Apelinin moleküler yapısı a) apelin-13 b) p[Glu] apelin-13, c) apelin-17, d) apelin-36
- Şekil 2.** Hipotalamusun organizasyonu
- Şekil 3.** Magnosellüler ve parvosellüler nöronların işlev mekanizması
- Şekil 4.** İnsan (A) ve sıçan (B) beyinde hipotalamus-hipofiz lokalizasyonu
- Şekil 5.** Hipotalamus sinyallerinin ön hipofize taşınması
- Şekil 6.** Testisin genel görünüşü
- Şekil 7.** Leydig hücrelerinin testiste yerleşimi
- Şekil 8.** Hipotalamik nükleusların yerleşimi
- Şekil 9.** Erkeklerde hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde geribildirim düzenlemeleri
- Şekil 10.** İştahın hipotalamik kontrolü
- Şekil 11.** Beslenmenin düzenlenmesinde geribildirim mekanizmaları
- Şekil 12.** Hipotalamusun susama merkezleri
- Şekil 13.** Deneye başlamadan önce sıçanların metabolik kafeslere yerleştirilmesi
- Şekil 14.** Ozmotik mini pompalar
- Şekil 15.** Beyin infüzyon kitinin görünümü
- Şekil 16.** Ozmotik pompa ve beyin infüzyon kitinin görünümü
- Şekil 17.** Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları
- Şekil 18.** Bregma noktasının görünüşü
- Şekil 19.** Beyin infüzyon kitinin lateral ventriküle yerleştirilmesi
- Şekil 20.** Beyin infüzyon kitinin dış yapıştırıcısıyla kafatasına sabitlenmesi
- Şekil 21.** Sıçanların ense derisi altına ozmotik pompanın yerleştirilmesi (A), Ozmotik pompa yerleştirildikten sonra cerrahi bölgenin dikilmesi ve temizlenmesi (B), Hayvanların metabolik kafeslere alınması (C).
- Şekil 22.** Femoral kanülasyon için sıçanların sabitlenmesi
- Şekil 23.** Femoral venin görünüşü
- Şekil 24.** Femoral vene kateter takılması
- Şekil 25.** Femoral venden kan alınması

- Şekil 26.** ELISA testosteron kit standartının seri dilüsyonları
- Şekil 27.** Testosteron kit çözeltilerin plaktaki bulunma düzeni
- Şekil 28.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler
- Şekil 29.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların yem tüketimlerinde meydana gelen (Ort± SH) değişiklikler
- Şekil 30.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların su tüketimlerinde meydana gelen (Ort± SH) değişiklikler
- Şekil 31.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların serum testosteron seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler
- Şekil 32.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların plazma LH salınımlarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler
- Şekil 33.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların plazma FSH salınımlarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler
- Şekil 34.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların testis ağırlıklarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler
- Şekil 35.** Kontrol grubundaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü
- Şekil 36.** 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü
- Şekil 37.** 10 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü
- Şekil 38.** Apelin-13 uygulamasından sonra seminifer tübül çaplarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler
- Şekil 39.** Kontrol grubundaki hayvanların Leydig hücrelerinin görünüşü
- Şekil 40.** 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların Leydig hücrelerinin görünüşü
- Şekil 41.** 10 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların Leydig hücrelerinin görünüşü
- Şekil 42.** Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların Leydig hücre sayılarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler

TABLolar DİZİNİ

- Tablo 1.** Apelin ve APJ' nin karakteristik özellikleri
- Tablo 2.** Apelin ve APJ mRNA' sının insan, sıçan ve fare dokularındaki dağılımı
- Tablo 3.** Hipotalamus ve ön hipofiz hormonları
- Tablo 4.** Hipotalamusa etki ederek gıda alımını düzenleyen hormonlar ve nörotransmitter
- Tablo 5.** Yapay BOS' un içeriği
- Tablo 6.** ELISA kit plakına yapılan pipetleme işlemi

1. GİRİŞ

Bağ dokusunun özel bir tipi olan adipoz doku yetişkin memelilerde adiposit olarak bilinen lipit dolu hücrelerin zayıf kimyasal etkileşimleri ile oluşmuştur. Yağ dokusu organizmadaki en büyük enerji kaynağı olarak bilinmekle birlikte enerjinin yağ hücresinde depolanması ve salgılanması hormonal sinyallerle (insülin, katekolaminler, glukokortikoidler gibi) kontrol edilmektedir (1). Adipositlerden ve adipositler arasında bulunan bağ dokusu hücrelerinden salgılanan proteinlerin (adipokinler) otokrin, parakrin ve endokrin etkileri olduğu gösterilmiştir (2). Bu nedenle adipoz dokunun sadece bir enerji deposundan ibaret olmayıp, aktif bir endokrin organ gibi çalıştığı ileri sürülmektedir (3,4).

1998 yılında Tatamoto ve ark. tarafından sığır mide öz suyundan izole edilen apelin, adipoz doku ailesinin yeni bir üyesidir (5). Apelin, G-protein kenetli peptit yapıda endojen bir ligandır ve APJ'ye bağlanarak etkilerini ortaya koyar (5,6,7).

Yapılan çalışmalar, apelinin kardiyovasküler fonksiyonlar (8), ön hipofiz fonksiyonları ve sıvı homeostazisin düzenlenmesi üzerinde rolünün olduğunu (9), ayrıca apoptozun baskılanmasında (10,11) görev aldığını ve insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonunda da bir koreseptör olarak işlev gördüğünü, (12,13,14) ortaya koymuştur.

APJ'nin sadece kalp, böbrek gibi periferik dokularda değil aynı zamanda hipotalamusun özellikle paraventriküler nükleus (PVN) ve supraoptik nükleus (SON) gibi merkezi alanlarda da dağılım gösterdiği ileri sürülmektedir (15). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, beyinde gıda alımı ve sirkadiyen ritimlerin düzenlendiği beyin bölgelerinde apelin sentezi yapan nöronların varlığı ortaya konulmuştur (16). Bu nükleuslarda apelin ve APJ'nin eksprese edilmesi, apelinin ayrıca su alımının merkezi olarak düzenlenmesinde de rol oynayabileceğine işaret etmektedir (16,17,18).

Hipotalamo-hipofizeal-gonadal eksen ve dolayısıyla üreme sistemi de apelin için önemli bir etki alanıdır. İnsan, sıçan ve fareler üzerinde yapılmış deneysel çalışmalar testis dokusunda, apelin ve APJ'nin varlığını ileri sürmektedir. İnsan prostat dokusunda apelin ve APJ'nin varlığı gösterilmiş, sıçan over ve uterus dokusunda yaygın olarak APJ reseptörlerini ekspresyonu ortaya konulmuştur (19).

Bu bulgular, üreme sistemi üzerinde apelinin önemli etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ancak hipotalamus, hipofiz ve gonadal ekseninde meydana gelebilecek hormonal değişikliklerin araştırıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Bu çalışmada, hipotalamik alanlarda yaygın olarak bulunan, gıda alımı, su dengesinin düzenlenmesi ve üreme ile ilişkili olaylarda rol aldığı ileri sürülen apelinin, erkek sıçanlarda intraserebroventriküler uygulama sonrası hipotalamus-hipofiz-gonadal ekseninde meydana getireceği değişiklikleri, ayrıca gıda ve su tüketimi üzerine oluşturacağı muhtemel etkilerin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Apelin

1993 yılında, anjiyotensin 2 tip 1 (AT1R) reseptörü geniyle benzer dizilime sahip bir gen keşfedildi (20). APJ olarak adlandırılan bu yeni reseptör anjiyotensin reseptörüyle benzerliğine rağmen, anjiyotensin 2 tarafından aktive edilmemekteydi. Bu G protein kenetli reseptör 1998'de Tatemoto ve ark. apelin olarak adlandırılan endojen ligandı tanımlayana kadar orfan reseptör olarak kaldı (5).

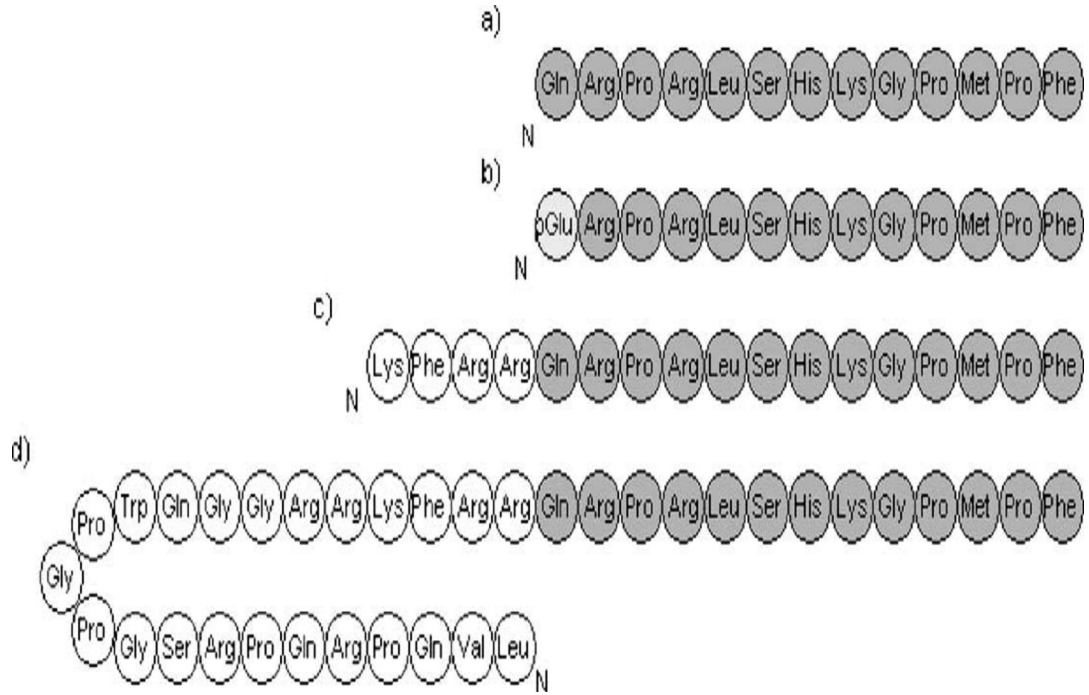
Vücudun çeşitli bölümlerindeki endotelial hücrelerde üretilen apelin adipoz dokunun yeni bir üyesidir (19). Yeni keşfedilen bu adipositokin, daha çok beyaz adipoz dokuda üretilir, ayrıca böbrek ve kalpteki kahverengi adipoz dokudan da üretilmektedir (21).

2.1.1. Apelinin biyokimyası

Apelin ve APJ mRNA tarafından kodlanmaktadır (19). Geni Xq25-26.1 kromozomu üzerinde bulunan apelin (22), 77 aminoasitlik (aa) bir preproapelin köken alır, bazı bölümlerinden parçalanarak farklı sayıda aa'lara (apelin-10, apelin-11, apelin-12, apelin-13, apelin-15, apelin-17, apelin-19 ve apelin-36 gibi) sahip fragmanlar oluşturur (19; Şekil 1).

Apelinin etkileri formlarına göre değişiklik göstermektedir. 13 ve 17 aa'dan oluşan apelin, 36 aa içeren apelin formundan daha güçlü bir biyolojik aktiviteye sahiptir (5). Apelinin yapısındaki 13 aa dizilimi tüm apelin formlarında değişmez olduğundan, temel apelin yapısı apelin-13 olarak kabul edilmektedir (23).

Apelin-13 N-terminal piroglutamat rezidülerine sahip olduğundan biyolojik aktivitesi diğer apelin formlarına oranla daha yüksektir. Apelin-36 bu özelliğe sahip olmadığından Apelin-13'e göre daha kısıtlı bir biyolojik aktiviteye sahiptir (21).



Şekil 1. Apelinin moleküler yapısı a) apelin-13 b) p[Glu] apelin-13, c) apelin-17 ve d) apelin-36. Koyu gri olan aa kısmı bütün apelin formları için ortak, açık renkli aa kısım formlara göre değişmektedir (19)

2.1.2. Apelin reseptörü

380 aa'dan meydana gelen APJ yedi transmembran bölgeden oluşan G protein kenetli reseptör geni kromozomun uzun kol bölgesinde yer almaktadır (20). APJ'ye ait gen tanımlanması birçok canlı türünde yapılmıştır (Tablo 1).

Apelinin, APJ eksprese eden hücrelerde forskolinle indüklenmiş siklik adozin monofosfat (cAMP) yapımını inhibitör G proteinlerine bağlanarak inhibe ettiği gösterilmiştir (24). Pertusis toksininin apelinin etkilerini bloke etmesi bu kanıyı ayrıca desteklemektedir (25).

Tablo 1. Apelin ve APJ'nin karakteristik özellikleri (19)

	APJ	APELİN
Sinonimleri	AT1R	APJ endojen ligand
Moleküler Sınıf	7 transmembran kenetlenmiş G protein reseptör	Peptid ligand
Aynı Yönlü etki	-	Özelliğe sahip değil
Zıt yönlü etki	(Ala13) apelin-13 (fonksiyonel antagonist)	Özelliğe sahip değil
aa sayısı	380	77
Moleküler ağırlığı (Da)	42,660	8569
mRNA boyutu (bp)	1143	234
Kromozom lokusu	11q12.1	X25-26.3
Türlerdeki gen tanımlanması	<p><i>Homo sapiens</i> (SwissProt P35414)</p> <p><i>Rattus norvegicus</i> (SwissProt Q9JHG3)</p> <p><i>Mus musculus</i> (Swissprot Q9WV08)</p> <p><i>Macaca mulata</i> (SwissProt O97666)</p> <p><i>Danio rerio</i> (EMBL AW460831)</p> <p><i>Xenopus laevis</i> (SwissProt P79960)</p>	<p><i>Homo sapiens</i> (SwissProt Q9ULZ1)</p> <p><i>Rattus norvegicus</i> (SwissProt Q9R0R3)</p> <p><i>Mus musculus</i> (SwissProt Q9R0R4)</p> <p><i>Bos taurus</i> (SwissProt Q9TUI9)</p> <p><i>Macaca mulatta</i> (EMBL BV209065)</p>

2.1.3. APJ'nin lokalizasyonu

İnsanlar, sıçanlar ve fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda birçok dokuda apelin ve APJ'nin varlığı tespit edilmiştir (Tablo 2). Apelin ve APJ'ye ait mRNA özellikle yüksek konsantrasyonda beyincik, damar endoteli, kalp, akciğer ve böbrekte bulunur (5,23,26,27). Sıçanların, böbrek, hipofiz bezi, over dokusu ve iskelet kaslarında düşük seviyelerde APJ mRNA'sının varlığı tespit edilmiştir (13). APJ'nin fare embriyolarının vasküler ve endokardiyal endotel hücrelerinde de var olduğu Devic ve ark. tarafından ayrıca gösterilmiştir (28). Sıçanların kalp damarlarında ve akciğer dokularında immunositokimyasal yöntemlerle, yüksek miktarda apelin mRNA'sı tespit edilmiştir. Lee ve ark. yaptıkları Northern blot analiz ve *in situ* hibridizasyon yöntemleri ile de bu bulgulara kesinlik katmışlardır (17).

İnsanlarda APJ'ye ait mRNA'nın dalak, timus, prostat, testis, yumurtalık, bağırsak, kalp, meme bezi ve C8166 kan hücreleri CD4 pozitif T-hücreleri gibi periferik dokularda varlığı tespit edilmiştir (29,30,31,32,33). Foldes ve ark. çalışmasında, Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) ile apelinin periferik lokalizasyonunun, insanda en fazla mide epitel hücrelerinde ve miyokard epitelinde olduğu ortaya konulmuştur (34).

APJ'nin perifer dokular haricinde hipokampus, serebellum, striatum ve hipotalamusta varlığı gösterilmiştir (9,25,35). Hipotalamus gibi bazı beyin bölgelerinde, apelin immünoreaktif nöronların daha yoğun olarak bulunduğu gözlenmiştir (16). Hipotalamusun SON ve PVN'de apelin ve APJ ekspresyonunun yoğun olduğu gösterilmiştir (16,18).

Tablo 2. Apelin ve APJ mRNA' sının insan, sıçan ve fare dokularındaki dağılımı (17,20,28,29,33)

	APJ			APELİN		
	Sıçan	Fare	İnsan	Sıçan	Fare	İnsan
Beyin	++	+	+++	+	+++	++
Serebellum	+		+	+		+
Hipofiz	+		+	+		++
Spinal Kort	+++	++	+	++	-	++
Adrenal bez	+			+		
Tiroid	++					
Dalak	-	+	+++	-	+	
Timus		+	+		-	
Kalp	++	+++	+	++	++	+
Endotel Hücreleri	++					
Akciğer	+++	++	++	+++	++	+
Mide	+		+	+		-
İnce bağırsak	+		++	+		
Kalın bağırsak	+		++	+		
Karaciğer	+	+		-	-	-
Pankreas	-		+	-		+
Böbrek	+	+	+	+	+	+
Testis	+	+	+	+	++	+
Prostat			+			+
Ovaryum	+	+	+	+	+	
Uterus	+	+	+	+	-	-
Plesenta	++		++			+++
Meme bezi	+			++		
İskelet kası	++	++	+	+	+	-
Adipoz doku	++	++	+	+	+	-

2.1.4. Apelinin etkileri

2.1.4.1. Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri

Apelinle ilgili ilk çalışmalar özellikle kardiyovasküler sistem üzerinde yoğunlaşmıştır (36). İnsan ve sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda apelin ve APJ'ye ait mRNA'nın kalp, damarlar ve periferde yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir (28,29,30,31,32) Hosoya ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada APJ'ye ait mRNA'nın sıçan kalp dokusunda yüksek seviyede bulunduğu rapor edilmiştir (25). İnsanlardaki damar endotel hücrelerinde yüksek seviyede APJ varlığı tespit edilmiştir (33), aynı şekilde bu durumun reseptörün ligandı olan apelin içinde geçerli olduğu gösterilmiştir (17). Apelinin, insanlardaki arterler, venler ve küçük damarlar da dahil olmak üzere damar boyunca endotel hücrelerinde tespit edilmesi (19) ve sıçan endotel hücrelerinde önemli miktarda varlığının gösterilmesi (27), apelinin kardiyovasküler sistemde önemli rollere sahip olabileceğini işaret etmektedir.

Apelin-13'ün erkek Wistar sıçanlara intravenöz (iv) infüzyonu ile sistolik ve diyastolik kan basıncında 10 mmHg'lik düşüş meydana gelmesi, apelinin kardiyovasküler sistemdeki fonksiyonları için ilk bulguları oluşturdu (17). Benzer bir deney düzeneği apelin-12, Apelin-13 ve Apelin-36 için kurulduğunda ise bu defa moleküler ağırlığı ile basınç değişikliğinin ters korelasyon gösterdiği ve en güçlü hipotansif etkiye apelin-12'nin sahip olduğu tespit edildi (27).

Apelinin düşük dozlarda arterial basıncı çok fazla etkilemediği, yüksek dozlarda ise bifazik arterial basınç cevabı oluşturduğu yani önce hipertansiyon sonrada hipotansiyon meydana getirdiği gösterilmiştir (37).

Apelinin damarlarda vazodilatatör (27,38) ve kalp üzerinde de pozitif inotropik etkileri (39) tanımlanmıştır. Lee ve ark. peptidin hipotansif etkilerini belirlemiş (17), Tatemoto ve ark.'da bu etkinin nitrik oksit aracılı olabileceğini ortaya koymuştur (27).

Anestezi altındaki sıçanlara icv olarak apelin enjeksiyonu ortalama kan basıncını etkilemezken (9), iv olarak enjekte edilmesi ortalama arteryal basınçta azalmalara sebep olmuştur (17). Kagiya ve ark. yaptığı çalışmada bilinci açık

sıçanlara hem icv, hem de iv apelin-13 uygulaması sonrası kalp hızı ve ortalama arteriyel basınçta doz bağımlı bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (40). Yine aynı çalışmada icv apelin-13 enjeksiyonu sonrası ortalama arteriyel basınç ve kalp hızındaki artışın, iv apelin-13 enjeksiyonundan sonra meydana gelen artıştan daha fazla olduğu tespit edilmiştir (40).

APJ sıçanların vasküler düz kas hücrelerinde apelin miyozin hafif zincirlerinin fosforillenmesine neden olur (41). Bu bulgular apelinin ağırlıklı olarak vasküler doku üzerindeki etkilerini, endotelden NO yapımını arttırarak meydana getirdiği ileri sürülmektedir. Spontan hipertansif sıçanlarda, tüm trans retinoic asit G protein reseptör sinyallerini düzenlemiş, kan basıncını azaltmış ve aortta apelin-APJ seviyesini arttırmıştır (42). Bu NO'nun artmasına ve anjiyotensin 1'in azalmasına eşlik eder. Apelinin sıçan portal venlerindeki vasküler tonusa direk bir etkisi yoktur ancak var olan endotele bağlı olmaksızın NO'ya bağlı bir mekanizma ile apelin vazokonstriktör etkiyi anjiyotensin 2'ye yanıt olarak ortadan kaldırır (43).

2.1.4.2. Sıvı elektrolit dengesi üzerine etkileri

Hipotalamusun SON ve PVN nöronları sıvı dengesinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (19). Merkezi sinir sisteminden salınan apelin, antidiüretik hormonu (ADH) ve başka mediyatörler yoluyla da çevre dokuları ve böbreği etkilemektedir. PVN ve SON'de bulunan APJ sinyal yayarak diüretik etkilerini ADH baskılanması üzerinden göstermektedir (9,44). Raux ve ark. yaptığı çalışmada 24 saat sudan yoksun bırakılan farelerde icv apelin-13 enjeksiyonundan otuz dakika sonra farelerde su alımında artış saptanmıştır (9). Raux ve ark. apelin-13'ün sıvı homeostazisini düzenleyici fonksiyonlarını belirlemiştir (9). Sıçanlara intraperitoneal (ip) (17) ve icv apelin-13 enjeksiyonu (45) sonrasında ilk 60 dakika aşırı bir su tüketimi olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada da Tobin ve ark. hipotalamik SON içine mikrodializ yöntemiyle Apelin-13 uygulamasının ADH nöronlarının elektrofizyolojik aktivitesini uyardığını ve somatodendritik ADH salıverilmesini indüklediğini göstermişlerdir (46).

2.1.4.3. Sindirim sistemi üzerine etkileri

APJ'nin mide enterokromafin hücrelerinde (47,48), pankreas hücrelerinde (49), ve kolon epitel hücrelerinde (50) bulunması, apelinin gastrointestinal sistemde birtakım rollere sahip olabileceğini işaret etmektedir.

Parietal hücreler tarafından salınan apelin ile enterokromafin hücre reseptörlerinin aktivasyonu, enterokromafin hücrelerden salınan histamini bloklamaktadır. Bu bloklama, parietal hücreler tarafından daha az asit sekresyonuna yol açmaktadır (48).

İv Apelin-36 uygulaması yapılan farelerde, pankreasta normal şartlarda hiperglisemiye yanıt olarak oluşan insülin salgısının meydana gelmediği gösterilmiştir (49). Bu durum apelin sinyalleri ile insülin sinyallerinin fonksiyonel olarak bağımlılığını ortaya koymaktadır. Aynı çalışmada insülinin adipoz dokudan apelin sekresyonunu uyardığı da gösterilmiştir (51).

Farelerde 24 saatlik açlık sonrasında, plazma insülin düzeyi ve adipoz dokuda apelin ekspresyonu azalmıştır. Buna bağlı olarak da plazma apelin düzeyi düşmektedir (51). Beslenme sonrasında ise, plazma apelin düzeyi ve adipoz dokudaki apelin mRNA seviyesi, tekrar normal düzeyine geri dönmektedir.

2.1.4.4. Gıda alımı üzerine etkileri

APJ, MSS'nin birçok bölgesinde eksprese edilmektedir. Sıçanların hipotalamusunda yeme alışkanlığını kontrol eden alanlarda SON ve PVN'nin apelin için en yoğun hedef bölgesi olabileceği ortaya konmuştur (15,16) Bu nükleuslarda apelin ve APJ ekspresyonunun oldukça yoğun olması (16,18) apelinin gıda alımı üzerine etkisi olabileceği yönünde sinyaller vermektedir.

Apelinin gıda alımı üzerine olan etkilerini özetleyen önemli bazı çalışmalar mevcuttur. Apelinin iv olarak uygulanması besin alımını etkilemezken, santral uygulanmasının besin alımında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (52,53). Taheri ve ark. yaptığı çalışmada ise lateral ventriküle 30 nmol icv apelin-13 enjeksiyonu sonrası, 24 saatlik zaman periyodunda gıda alımında anlamlı bir değişiklik meydana gelmediği gösterilmiştir (45). Sunter ve ark. iv olarak 10 nmol

apelin-13 enjeksiyonu sonrasında hem açlığa maruz bırakılan hemde normal beslenmesine devam eden sıçanlarda 24 saatlik zaman periyodunda gıda alımında herhangi bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir (52). Higuchi ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada farelere 14 gün boyunca ip 0.1 $\mu\text{mol kg/gün}$ apelin enjeksiyonunun, gıda alımında herhangi bir değişiklik meydana getirmediği görülmüştür (54).

Obez deney hayvanları ve obez insanlarda, plazma apelin düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir (51,55). Adipoz dokudaki apelin gen ekspresyonunun insulin ve TNF alfa tarafından yükseltildiği gösterilmiştir (56).

2.1.4.5. Üreme sistemi üzerine etkileri

Hipotalamo-hipofizeal-gonadal eksen ve dolayısıyla üreme sistemi de apelin için önemli bir etki alanıdır. Habata ve ark. (24) sıçan ovaryum dokusunda apelin ekspresyonu olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı grup, sıçan meme dokusunda gebelik ve laktasyon döneminde apelin ekspresyonunda ciddi artışlar olduğunu rapor etmişlerdir (24). Daha sonraki bir çalışmada ise Hosoya ve ark. (25), sıçan over ve uterus dokusunda yaygın olarak APJ reseptörlerinin ekspresyonunu ortaya koymuşlardır. Sığır ovaryum teka tabakasında apelin sentezinin varlığı belirlenmiş, granüloza hücrelerinde de APJ gösterilmiştir (57).

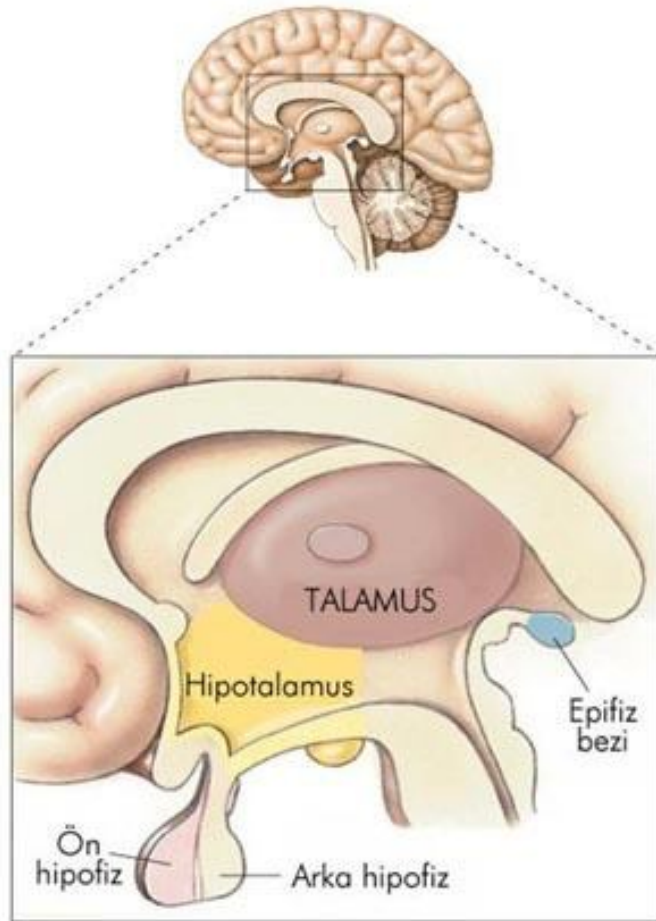
İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, fetüs ve plasenta da apelinin yüksek konsantrasyonlarda bulunması, apelinin intrauterin büyümede rolü olabileceğini düşündürmektedir (58).

Ancak hipotalamus, hipofiz ve gonadal eksende meydana gelebilecek hormonal değişikliklerin ve özellikle erkek üreme sistemi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmaların sayısı yetersizdir.

2.2. Hipotalamus

2.2.1. Hipotalamusun fonksiyonları

Anatomik olarak hipotalamus, anteriorde optik kiyazma, posteriorıda mamiller cisimler, lateralde temporal lob ve superiorda talamus ile bağlantılıdır (59; Şekil 2). Hipotalamus memeli beyninin çok küçük bir parçasını (insandaki 1400 gramlık beynin sadece 4 gramı) oluşturmasına rağmen, beyindeki en önemli kısımlardan bir tanesidir. Hipotalamustan çıkan sinyaller çevre dokular ve diğer beyin bölgelerinde uygun nöroendokrin cevabın oluşmasını uyarır.



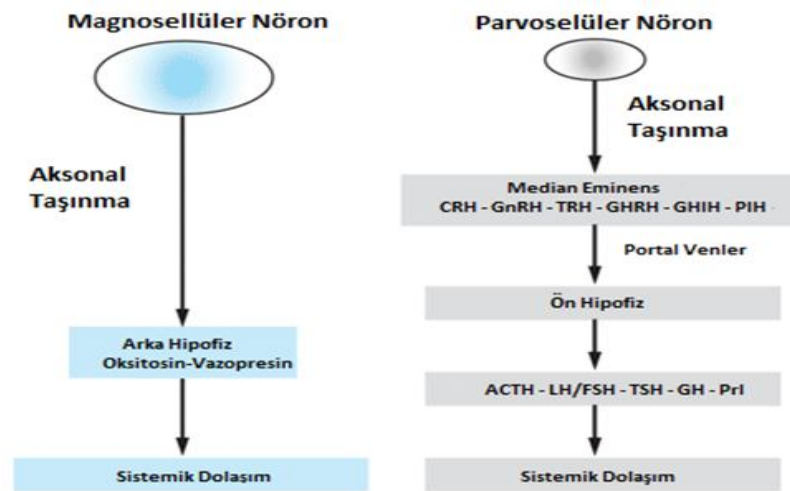
Şekil 2. Hipotalamusun organizasyonu (60)

Gıda alımı, enerji harcama, vücut ağırlığı, sıvı alımı ve düzenlenmesi, kan basıncı, susama, üreme, vücut sıcaklığı ve uykunun düzenlenmesi gibi birçok açıdan günlük yaşamsal faaliyetler hipotalamustan salınan salgıya uygun hipotalamik cevapların verilmesi ile kontrol edilir. Bu hipotalamik cevapların oluşmasına, hipotalamusta meydana gelen salgılar aracılık etmektedir (61). Hipotalamustan başlıca kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH), gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) , büyüme hormonu serbestleştirici hormon (GHRH), tirotropin serbestleştirici hormon (TRH), prolaktin baskılayıcı hormon (PIF) salgılanmaktadır (62). Hipotalamustan salınan hormonlara, uygun endokrin cevap hipofiz tarafından verilmektedir (63).

2.2.2. Hipotalamik nükleuslar

Magnosellüler (MN) ve parvosellüler (PN) adı verilen iki tip nöron hipotalamusun endokrin fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok önemlidir. MN' ların aksonları median eminensi geçerek arka hipofizde sonlanır (64). Böylece arka hipofizden oksitosin ve ADH salınımını kontrol edilir (Şekil 3).

PN'ların aksonları ise median eminens, beyin sapı ve spinal korda uzanarak salgılatıcı (relasing) veya baskılayıcı (inhibiting) hormonlar salarak ön hipofiz fonksiyonlarının kontrolünü sağlarlar (65).



Şekil 3. Magnosellüler ve parvosellüler nöronların işlev mekanizması (65)

2.2.3. Hipotalamustan GnRH salgılanması

GnRH 10 aa dizisinden oluşmuş olup hipotalamusun, medial preoptik nükleus (MPN), SON, PVN ve arkuat nükleusunda (ARN) sentezlenir. Birçok memeli türünde GnRH nöronları hipotalamusun rostral bölgesinde bulunan preoptik alan ve ona yakın bölgelerde dağılım göstermektedir. Sinir ağı şeklinde yapılandığına inanılan bu dağınık nöronlar, koordineli bir GnRH puls jeneratörü şeklinde işlev görür (66). Levin ve ark. tarafından, GnRH'nın, hipotalamik nörovasküler terminallerden, portal dolaşıma pulsatil salındığı gösterilmiştir (67).

GnRH üç şekilde salınım gösterir. Birincisi; mevsimsel salınım yaparak ilkbaharda en üst düzeye çıkar. İkincisi; melatonin ilişkili olduğu düşünülen sirkadyen ritimde sabah erken saatlerde en yüksek seviyeye çıkar. Üçüncüsü ise, 90 ile 120 dakikada bir pulsatil ritim gösterir.

GnRH'nın pulsatil salgılanması hipotalamusun medyobazal bölgesinde, özellikle ARN'de, nöronal uyarı sonucu gerçekleşir. Bu pulsatil salgı sürekli olmayıp her 1-2 saatte bir gerçekleşir ve 5-25 dakika süreyle devam eder (62).

GnRH pubertenin başlatılmasını kontrol eder ve ön hipofiz gonadotropinlerinden LH ve FSH sekresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (68, 69). Bu faaliyetler GnRH'nın üreme sisteminin kontrolünde önemli roller üstlendiğini göstermektedir.

Hipotalamustan GnRH salgısının, hipotalamik-hipofizer portal kan dolaşımı ile pulsatil LH salınımını neredeyse eşit şekilde takip ettiği sıçan, koyun ve maymunlar üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (70,71). *In vitro* olarak insan hipofiz bezinde GnRH uyarısı olmadan hipofizden düzensiz ve düşük genlikte LH salınımı (72), GnRH uyarısı olduğunda ise yüksek ve düzenli genlikte LH salınımı gerçekleştiği gösterilmiş (73).

2.3 Hipofiz

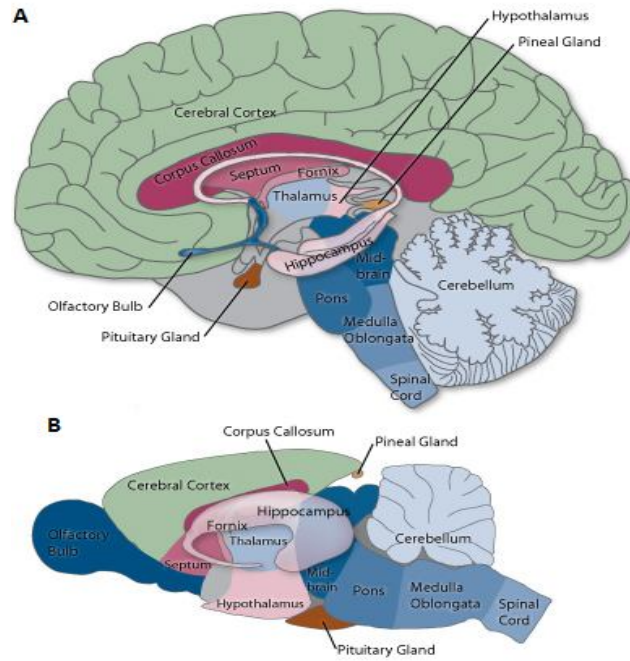
2.3.1. Hipofiz bezinin fonksiyonları

İnsanlarda hipofiz yaklaşık; 6 mm vertikal, 12 mm transvers, 8mm anteroposterior uzunlukta, 0.5 gr ağırlıkta bir dokudur. İfundibulum ile beyne bağlanır ve fossa hipofisialise oturur (Şekil 4).

Hipotalamusun kontrolünde olan hipofiz bezi hipotalamusun hemen altında olup adenohipofiz (ön lob) ve nörohipofiz (arka lob) olmak üzere iki kısımdan meydana gelmiştir. Bu iki bölümün arasında, insanlarda yok sayılabilecek kadar küçük, ancak bazı daha aşağı grup hayvanlarda çok daha büyük, işlevsel ve nispeten damarsız bir bölge olan pars intermedya vardır. Ara lob olarak kabul edilen bu bölge özellikle büyük miktarda melanosit salgılatıcı hormon (MSH) salgılar (62).

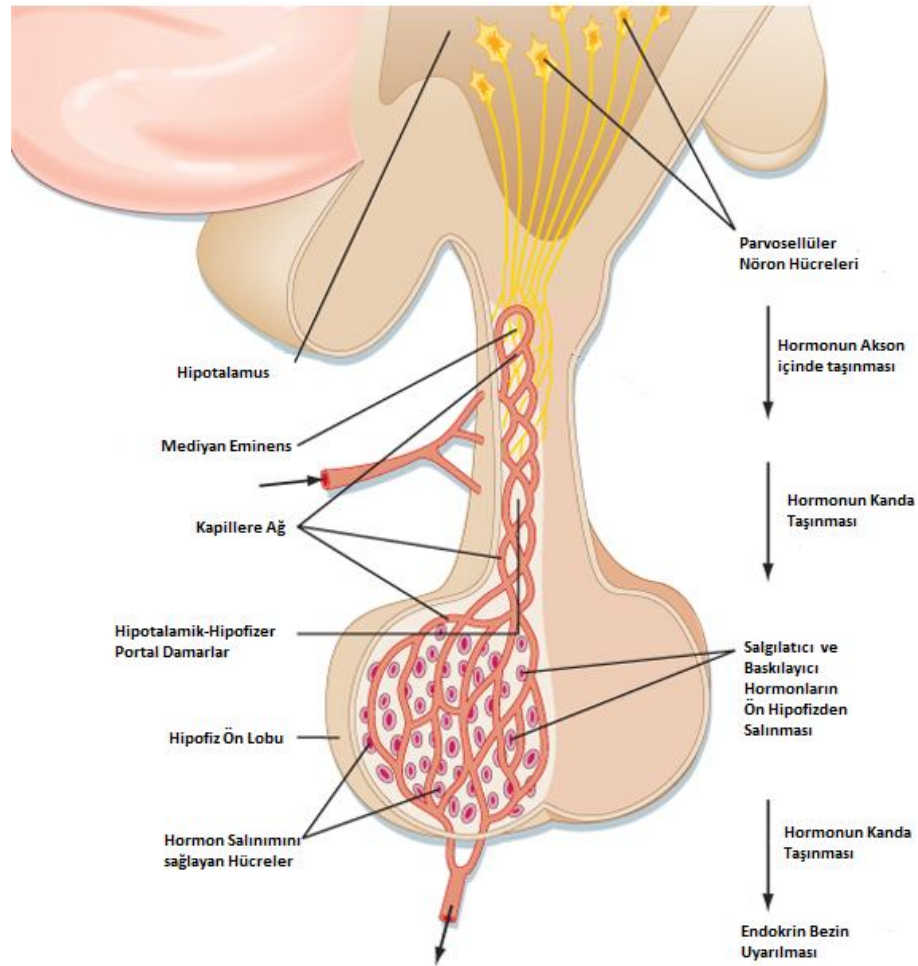
Nörohipofiz hipotalamusta yapılan bazı kimyasal maddeleri kana verir, kendisi herhangi bir madde yapmaz.

Nörohipofizden salınan hormonlar oksitosin ve ADH'dır. Oksitosin ve vazopressin hormonlarının salınımı nöral mekanizmayla gerçekleşmektedir (65).



Şekil 4. İnsan (A) ve sıçan (B) beyninde hipotalamus-hipofiz lokalizasyonu (74)

Adenohipofiz ise yapı olarak bir bezdir ve hipotalamusun kontrolü altındadır. Hipofiz ön lobunun pars distalis kısmına, hipotalamohipofizial traktustan portal sistem yoluyla, salgılatıcı ve baskılayıcı faktörler olarak bilinen kimyasal maddeler taşınır (Şekil 5). Yani hipofiz ön lobundan salınan her hormon için hipotalamusta ayrı bir salgılatıcı faktör salınmaktadır (62) ve her salgılatıcı hormon ayrı bir ön hipofiz hücresine etki etmektedir (tirotrop, gonadotrop, kortikotrop, somatotrop ve laktotrop). Adenohipofizden salınan başlıca hormonlar büyüme hormonu (GH), adrenokortikotropik hormon (ACTH), tiroid uyarıcı hormon(TSH), prolaktin FSH ve LH'dır (75; Tablo 3).



Şekil 5. Hipotalamus sinyallerinin ön hipofize taşınması (76)

Ön hipofizdeki hücrelerin yaklaşık %5-10'u gonadotrop hücrelerden oluşmaktadır. Ön hipofizden humoral kontrol ile gonadotrop hücrelerden salınan gonadotropik hormonlar (LH ve FSH) üreme sisteminin düzenlenmesinde temel roller oynamaktadırlar.

Tablo 3. Hipotalamus ve ön hipofiz hormonları

Hipotalamustan salınan hormonlar	Hipotalamus nükleusu	Ön hipofizden salınan hormon	Etki ettiği hücre
TRH	PVN	TSH, Prolaktin	Tirotrop
GnRH	PVN SON ARN MPN	LH, FSH	Gonadotrop
CRH	PVN	ACTH	Kortikotrop
GHRH	ARN	GH	Somatotrop
GHIH (Somatostatin)	PVN	GH	Somatotrop
PIF	ARN	Prolaktin	Laktotrop

2.3.2. Hipofiz bezinden LH salgılanması

Alfa ve beta olmak üzere iki alt birimden oluşan LH, glikoprotein yapısında bir hormondur. Alfa alt ünitesi 89, beta alt ünitesi ise 115 aa'dan meydana gelmektedir (62). Molekül ağırlığı 30.000 dalton ve yarı ömrü 30 dakikadır (65).

LH, GnRH'nın uyarısıyla ön hipofizdeki gonadotropik hücrelerden pulsatil (tonik) tarzda salınır (77,78). LH ile GnRH salgısı arasındaki yakın ilişki nedeniyle GnRH aynı zamanda LH serbestleştirici hormon olarak da kabul edilir.

LH, erkeklerde testislerdeki Leydig (intersitisyel) hücrelerini uyararak testosteron salınımını uyarırlar.

2.3.3. Hipofiz bezinden FSH salgılanması

Glikoprotein yapısında bir hormon olan FSH'da, LH gibi alfa ve beta olmak üzere iki alt birimden oluşmuştur. Alfa alt ünitesi 89, beta alt ünitesi ise 112 aa'dan meydana gelmektedir (62). Alfa alt ünitesi reseptör için bağlanma bölgesini oluştururken, beta alt ünitesi FSH'ya özgü biyolojik etkilerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. FSH'nın yarılanma ömrü 1-3 saattir (65).

GnRH'nın uyarısı ile ön hipofizden salınan FSH, GnRH'daki küçük değişimlere LH gibi eşlik etmez bu nedenle salgılanması pulsatil tarzda değildir. FSH, GnRH'da meydana gelen uzun süreli değişimlere ancak birkaç saat sonra çok yavaş yanıt verir (62). FSH'nın testisler üzerindeki asıl etkisi sertoli hücrelerini ve spermatogenezi uyarmaktır (79).

2.4. Testis

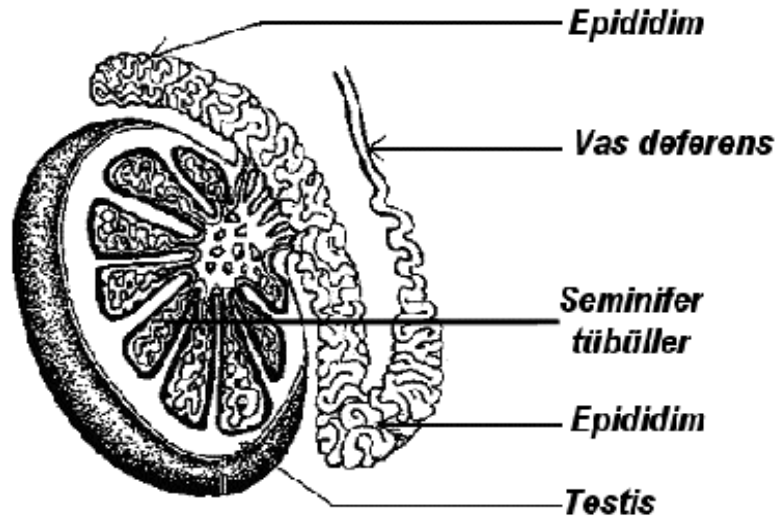
2.4.1. Testisin fonksiyonları

Testisler skrotal kesede yer alan bir çift organ (Şekil 6) olup, Leydig hücrelerinde testosteron, sertoli hücrelerinde sperm yapımı ile özelleşmiştir (79). Fötal Leydig hücrelerinde, testosteronun üretimi erkek fenotipinin gelişimi için belirleyicidir. Dolayısıyla, testisler erkeklerde cinsiyeti ve fertilitiyi kontrol eder (79). İnsan fetal testisinde gebeliğin 7. haftasında başlayan Leydig hücrelerinin farklılaşması ve testosteron biyosentezi, LH'dan bağımsızdır (80). Ancak testis gelişimi sırasındaki testosteron üretimi, hipofiz tarafından üretilen LH'nın kontrolü altındadır.

Testislerin fonksiyonlarını kısaca şöyle özetleyebiliriz (62);

- Germ hücresi üreterek türün devamlılığını sağlamak
- Cinsel farklılaşmanın olmasını sağlamak
- İkincil seks karakterlerinin kazanılması
- Androjen sentezlemek ve salgılamak

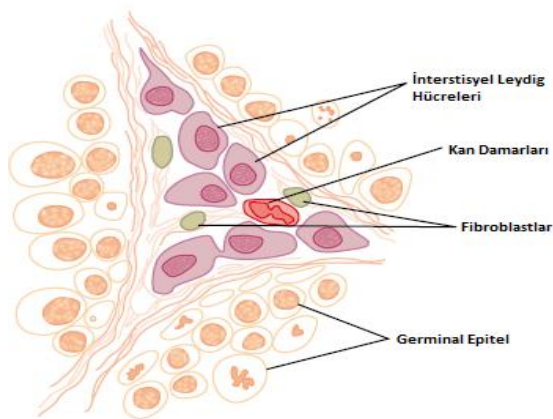
Testiste üretilen temel androjen testosteron, erkek üreme sisteminin en önemli hormonlarından biridir.



Şekil 6. Testisin genel görünüşü (81)

2.4.2. Leydig hücreleri

Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasında intertisiyel alanlarda yer alırlar ve erişkin testis kütlelerinin %20'sini oluştururlar (Şekil 7). Leydig hücreleri testislerin testosteron salgılamadıkları çocukluk döneminde hemen hemen hiç görülmezler. Yeni doğan erkek çocukta yaşamın ilk birkaç ayında (bazen bir yıl kadar uzun) ve puberte sonrası erişkin dönemde bol miktarda testosteron salgırlar (62).



Şekil 7. Leydig hücrelerinin testiste yerleşimi (62)

Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron; spermatogenezin oluşması, erekeğe ait cinsiyet özelliklerinin ortaya çıkması ve neslin devamlılığı için gereklidir. Leydig hücrelerinin büyümesi, gelişmesi ve işlevleri LH'nın tropik etkisine bağlıdır. LH'nın yokluğu Leydig hücrelerinin küçülmesine ve testosteron üretiminin durmasına yol açarken, LH'nın aşırı salgılanması Leydig hücrelerini uyararak hipertrofiye sebep olur.

LH, Leydig hücrelerinin membranı üzerindeki özgün reseptörlerine bağlanarak etkilerini ortaya koyar (82). Böylece testosteron yapımı ve salınımı için gerekli hormonal uyarı gerçekleşir (83). Leydig hücreleri testosteron ürettiği müddetçe, LH üzerinde negatif geribildirim ile hormonal homeostaz sürdürülür. LH salgısındaki artışlardan 30-60 dakika sonra kanda testosteron seviyeleri yükselir. Testosteron seviyesindeki bu artış negatif geri bildirim oluşturarak LH salınımını durdurur ve bunu takiben testosteron seviyeleri düşer.

2.4.3. Sertoli hücreleri

Seminifer tübüller iki tip somatik hücre (miyoid ve sertoli hücresi) ile beş tip germ hücresi (spermatogonia, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler, spermatozoa) içermektedir.

Sertoli hücreleri düzensiz silindirik şekilli olup büyük bir çekirdeğe sahiptir. Tübülün lümeninden tabanına doğru uzanan ve germ hücreleri ile sıkı temas halinde olan sertoli hücrelerinin çoğalması fetal yaşamda başlar ve puberteye kadar devam eder.

Sertoli hücrelerin membranında (FSH için), çekirdeğinde ve sitoplazmasında (androjenler için) reseptörler bulunur. Sertoli hücreleri spermatogenez için uygun bir ortam sağlanmasında önemli bir rol oynar. FSH sertoli hücrelerini aktive etmek suretiyle germ hücrelerinde mayozun tamamlanmasını sağlar.

Protein yapısında bir hormon olan inhibin FSH uyarımına bir yanıt olarak sertoli hücrelerince üretilir ve negatif geri bildirim ile hipofiz ön lobundaki gonadotropılara etki ederek FSH salgılanmasını baskılar (62). Alfa ve beta olmak üzere 2 alt birimden oluşan inhibine, biyolojik kimliği kazandıran beta alt ünitesidir. Sertoli hücreleri tarafından üretilen ve kimyasal olarak inhibine benzeyen bir

molekül olan aktivin (fakat inhibine antagonisttir) ise hipofiz bezi üzerine pozitif geri bildirim uygular ve böylece FSH salgılanmasını uyararak germ hücrelerinin gelişmesini (spermatogenezi) sağlar (64).

2.4.4. Testosteron salgılanması

Testosteron sentezi, kolesterolün Leydig hücrelerinde mitokondri ve sitoplazmada ard arda geçirdiği kimyasal süreç sonunda gerçekleşir (84,85). Testosteronun %95'i testisin Leydig hücrelerinde, %5'i ise adrenal kortekste sentezlenir. Kadınlarda ise testosteron büyük oranda adrenal kortekste, daha az olarak da ovaryum ve plasentada sentezlenir. Testosteron salınımı yaş ilerledikçe azalır ve yaşamın sonuna kadar (azalarak) devam eder (86).

Testosteron, erkeklerde sakalların çıkması, sesin kalınlaşması gibi sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkmasını sağlar (79). Fetal yaşamda testisler plasenta tarafından üretilen insan koryonik gonadotropini ile uyarılarak, testosteron salgırlar. Bu hormon fetal gelişim döneminde ve hatta doğumdan sonra 14 hafta kadar vücutta bulunur (87). Doğumdan puberteye kadar (yaklaşık 10-13 yaş) testosteron üretimi olmaz (62). Testosteron hormon seviyesinin puberte döneminde yüksek olması, pubertede erkeği kadından ayıran karakteristik özelliklerin ortaya çıkmasını sağlar.

Testosteronun yaklaşık olarak %44'ü seks hormonu bağlayıcı globüline, %54'ü albümine bağlanarak geriye kalan ise (%2-3) kanda serbest olarak taşınır (88). Dolaşımdaki testosteron, geri bildirim mekanizması ile hipotalamusdan GnRH salgılanma sıklığını azaltır ve hipofizden gonadotropinlerin salınımını baskılar (64).

2.5. Hipotalamus-hipofiz-testis eksen

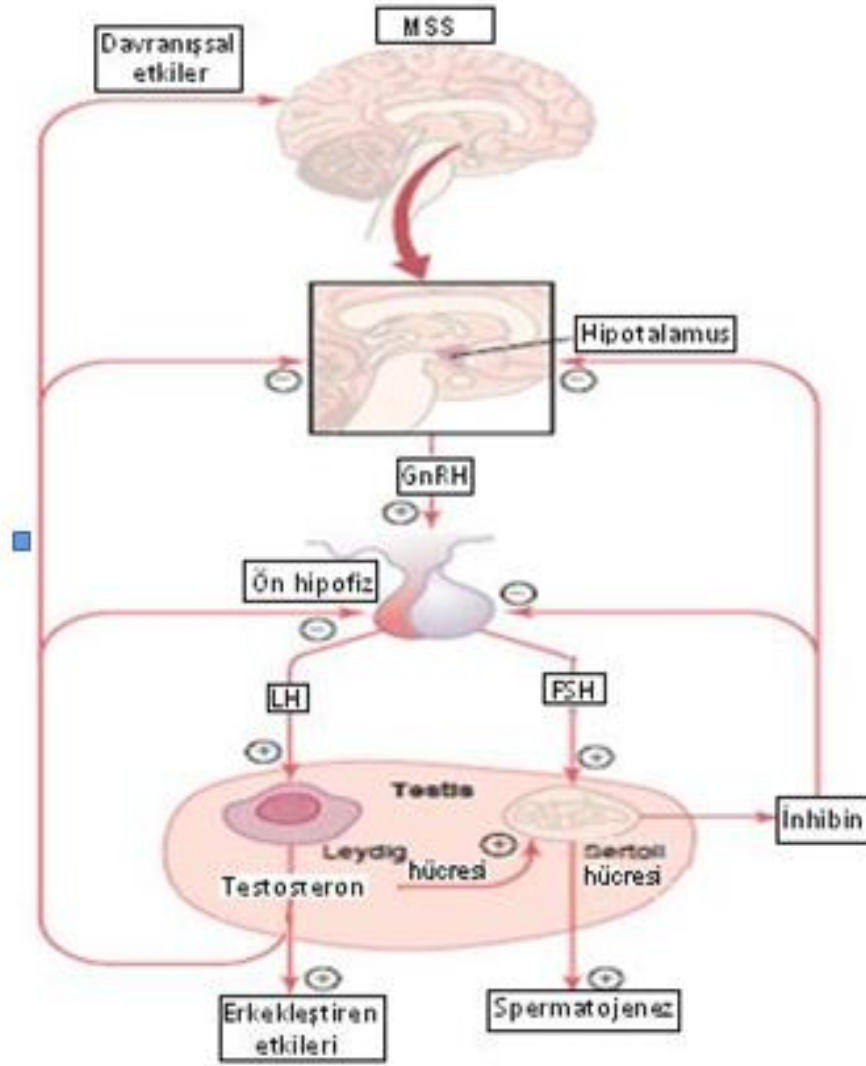
Hipotalamus-hipofiz-testis aksının en önemli parçalarından biri olan hipotalamus hem merkezi sinir sisteminin (MSS) nöral mesajları hem de testislerin hormonal mesajları ile GnRH sekresyonunu düzenler. Üremenin kontrolünü sağlayan en önemli hormon olan GnRH, yaygın biçimde hipotalamusun SON, PVN, MPN, ve ARN'sinde (Şekil 8) sentez edilir ve aksoplazmik akım ile median eminente

bulunan akson terminallerine taşınır. Buradan iki yönlü akım gösteren mikrovasküler portal dolaşım ile pulsatil olarak salınır (endokrin fiz.). Bu bölgedeki nöronlardan salgılanan GnRH, hipotalamus-hipofiz portal sistemi damarlarına serbestlenir. Daha sonra GnRH portal kan yoluyla ön hipofize taşınarak gonadotrop hücrelerden LH ve FSH'nın salgılanmasını uyarır. LH ve FSH, testislerdeki hedef hücrelerde cAMP ikinci haberci sistemini aktive ederek etkisini gösterir.



Şekil 8. Hipotalamik nükleusların yerleşimi (89)

LH bu yolla testislerdeki Leydig hücrelerini aktive ederek testosteron salınımını gerçekleştirirken FSH, sertoli hücrelerini aktive ederek testosteron varlığında spermatojenezi uyarır. Ayrıca FSH'nın sertoli hücrelerini uyarmasıyla inhibin salınımında gerçekleşir. (Şekil 9).



Şekil 9. Erkeklerde hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde geribildirim düzenlemeleri (62)

2.6. Beslenmenin hipotalamik kontrolü

Hipotalamusun çeşitli sinirsel merkezleri beslenmenin kontrolüne katılır. Hayvanların, hipotalamusuna mikroenjeksiyon yapılması veya hipotalamusta mikrolezyon oluşturma çalışmaları bu bölgenin besin alımıyla yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (90).

Hipotalamusun özellikle lateral ve ventromediyal çekirdekleri (VMN) besin alımının düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır. Hipotalamusun lateral

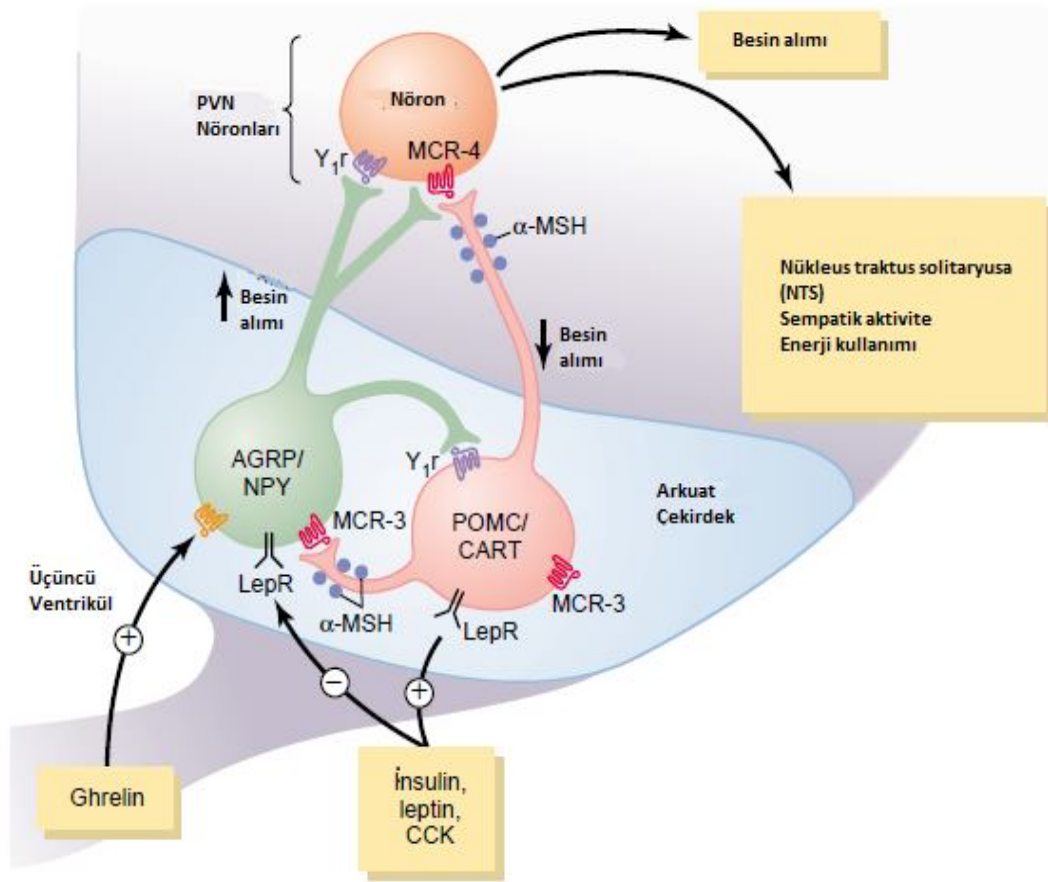
çekirdekleri açlık merkezi olarak görev yaparlar. Bu çekirdeklerin uyarılması oburca yeme (hiperfaji) davranışının sergilenmesine yol açar. Bunun aksine lateral hipotalamusun harabiyeti, besine karşı isteği ortadan kaldırır ve belirgin kilo kaybı, kas zayıflığı ve metabolizmanın yavaşlaması ile ilerleyici zayıflamaya yol açar. Lateral hipotalamik beslenme merkezinin uyarılması, besin arama dürtüsünü uyarır.

Tokluk merkezi olarak görev yapan VMN'lerinin beslenme ile ilgili tatmin duygusu verdiği ve beslenme merkezini baskıladığı ileri sürülmüştür. Bu alanın elektriksel olarak uyarılması tokluk duygusu oluşturarak, çok iştah açıcı gıdaların bile reddedilmesine (afaji) sebep olmaktadır. İnsanlarda ve hayvanlarda bu alanın haraplanması ise oburluğa ve aşırı kilo alımına neden olmaktadır (91). VMN'ler, besin alımıyla uyarıldığında, alfa-adrenerjik reseptörler aracılığıyla, tokluk hissi oluşturduğu ve besin alımını durdurduğu; lezyonlarında kilo alımını takiben obezite geliştiği bildirilmiştir (92).

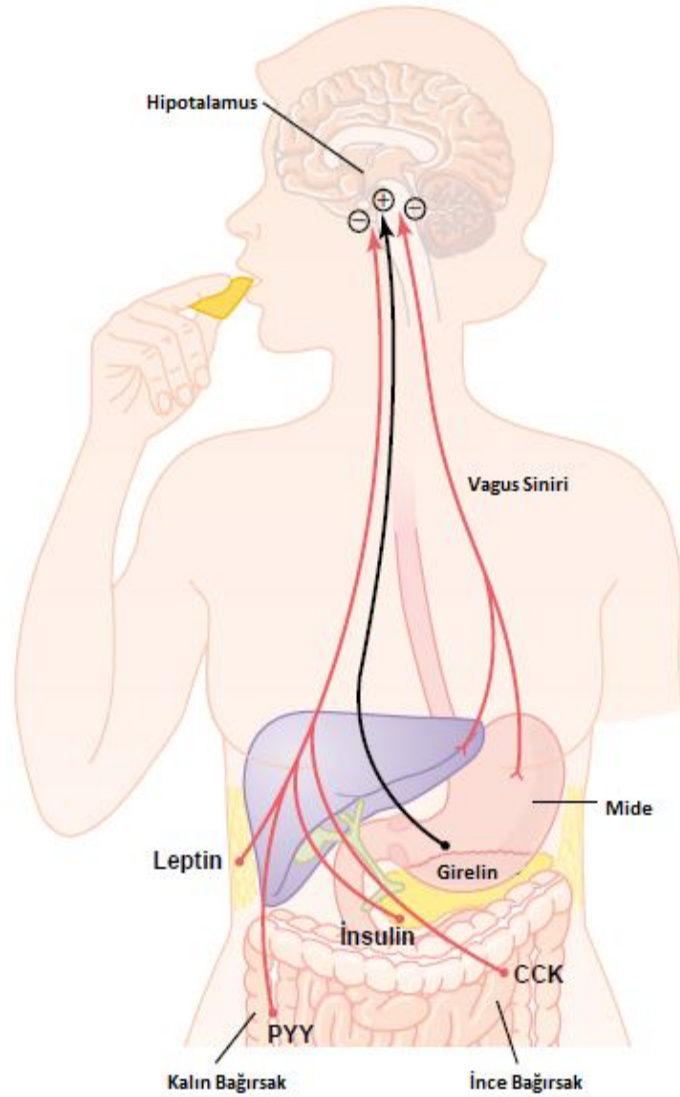
Hipotalamusun PVN, dorsomedyal ve ARN'nin da besin alımını düzenlediklerine inanılmaktadır. PVN'nin lezyonları sıklıkla aşırı yemeye neden olurken, dorsomedyal çekirdeklerdeki lezyonlar ise yeme davranışını genellikle baskılar.

ARN ise sindirim sisteminden ve yağ dokusundan salınan çok sayıda hormonun besin alımı ve enerji harcanmasını düzenlemek üzere etkilerinin birleştiği bir hipotalamus bölgesidir (62). Hipotalamus nöronları arasında çok yoğun etkileşimler vardır ve bu alanlar hep birlikte yeme davranışını kontrol ederler (Şekil 10).

Hipotalamus ayrıca gastrointestinal kanaldan gelen duysal bilgileri (midenin dolu olması gibi), kanda tokluk hissi veren besin maddeleri ile ilgili (glikoz, aa, yağ asiteleri gibi) kimyasal sinyalleri, gastrointestinal sistemden gelen hormonal sinyalleri ve beslenme davranışını etkileyen serebral korteks kaynaklı sinyalleri de (görme, koku, tat) alır (Şekil 11).



Şekil 10. İştahın hipotalamik kontrolü (62)



Şekil 11. Beslenmenin düzenlenmesinde geribildirim mekanizmaları (62)

Hipotalamusun açlık ve tokluk merkezlerinde beslenmeyi etkileyen nörotransmitterler ve hormonlar için yüksek yoğunlukta reseptörler bulunur. Hipotalamusta beslenme ve tokluk merkezlerini etkileyen, iştah açıcı (oreksijenik) ve iştahı baskılayıcı (anoreksijenik) özellikle birçok nörotransmitter ve hormon bulunmaktadır (Tablo 4).

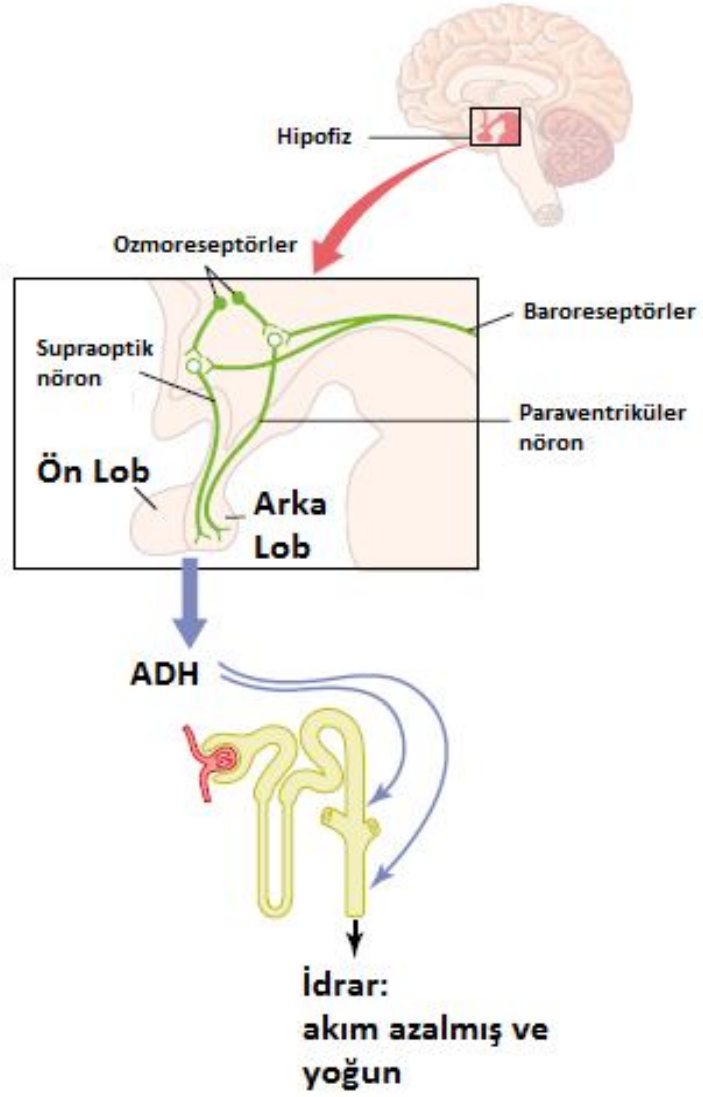
Tablo 4. Hipotalamusa etki ederek gıda alımını düzenleyen hormonlar ve nörotransmitter (62)

Beslenmeyi Azaltanlar	Beslenmeyi Arttıranlar
Leptin	Nöropeptid Y
İnsulin	Aguti-ilişkili protein
Serotonin	Melanin-yoğunlaştırıcı hormon
Norepinefrin	Oreksin A ve B
Kortikotropin serbestleştirici hormon	Endorfinler
Kolesistokin	Galanin
α MSH	Glutamat ve GABA
Glukagon-benzeri peptid	Kortizol
Kokain ve amfetamin ilişkili transkript Peptid YY	Ghrelin

2.7. Susamanın hipotalamik kontrolü

Ozmolarite değişikliklerine cevap olarak hipotalamusun başlıca SON'da sentezlenen ve arka hipofizden dolaşıma verilen ADH böbrek tübüllerinden suyun geri emilmesini sağlar. Ozmolarite ve ADH salgılanmasının kontrolünde önemli bir diğer nöronal alan da 3. ventrikülün anteroventral bölgesidir (AV3V). Bu bölgenin uyarılması su içme isteğine sebep olur. AV3V bölgesinin lezyonları ADH salgısında, susamada, sodyum iştah ve kan basıncının kontrolünde çok yönlü bozukluklara yol açar (62).

AV3V bölgesinin ve SON'un yakın alanlarında, ekstrasellüler sıvı ozmolaritesindeki artışlarla uyarılan nöronal hücreler (ozmoreseptörler) de ekstrasellüler sıvının ozmolarite değişikliklerine hızlı cevap vererek ADH sekresyonu ve susamayı güçlü bir şekilde kontrol eder (Şekil 12).



Şekil 12. Hipotalamusun susama merkezleri (62)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Yeditepe Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (YÜDETAM) ve Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırmaları Laboratuvarı gerçekleştirildi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafınca onaylanan çalışmadaki bütün uygulamalar etik kurul protokolünde belirtildiği şekilde yapıldı.

3.1. Deney hayvanları

Çalışmada, ortalama ağırlıkları 300-350 gram olan Wistar Albino cinsi toplam 21 adet erkek sıçan kullanıldı. Uygulamalara başlamadan önce tüm sıçanların ağırlıkları belirlendi. Gruplar, vücut ağırlık ortalamaları birbirlerine en yakın olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (n=6), düşük doz apelin-13 (1 nmol) uygulanan grup (n=7) ve yüksek doz apelin-13 (10 nmol) uygulanan grup (n=7).

Sıçanlar ortama alışmaları amacıyla deneylere başlamadan 2 gün önce metabolik kafeslere (Tecniplast 3700 M, İtalya) yerleştirildi (Şekil 13).

Deney hayvanları $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık-karanlık ortamda tutuldular. Sıçanlar *ad libitum* olarak standart sıçan yemi ile beslendiler ve normal musluk suyu içtiler.



Şekil 13. Deneye başlamadan önce sıçanların metabolik kafeslere yerleştirilmesi

3.2. Hazırlık

3.2.1. Yapay beyin omurilik sıvısı hazırlanması

Yapay beyin omurilik sıvısı (BOS) hazırlamak amacıyla içeriği aşağıdaki tablolarda belirtilen şekilde 500 ml distile su içerisinde iki farklı solüsyon (A ve B solüsyonu) hazırlandı (Tablo 5). A ve B solüsyonları 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak yapay BOS elde edildi (93).

Tablo 5. Yapay BOS'un içeriği (93)

A solüsyonu		B solüsyonu	
İçerik	Gram	İçerik	Gram
NaCl	8.66	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.214
KCl	0.224	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.027
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.206		
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.163		

3.2.2. Ozmotik pompaların hazırlanması

Deneyleerde yedi gün süreyle 10 µl/saat icv infüzyon yapma özelliğine sahip mini ozmotik pompalar (Alzet 2ML1, ABD) kullanıldı (Şekil 14).

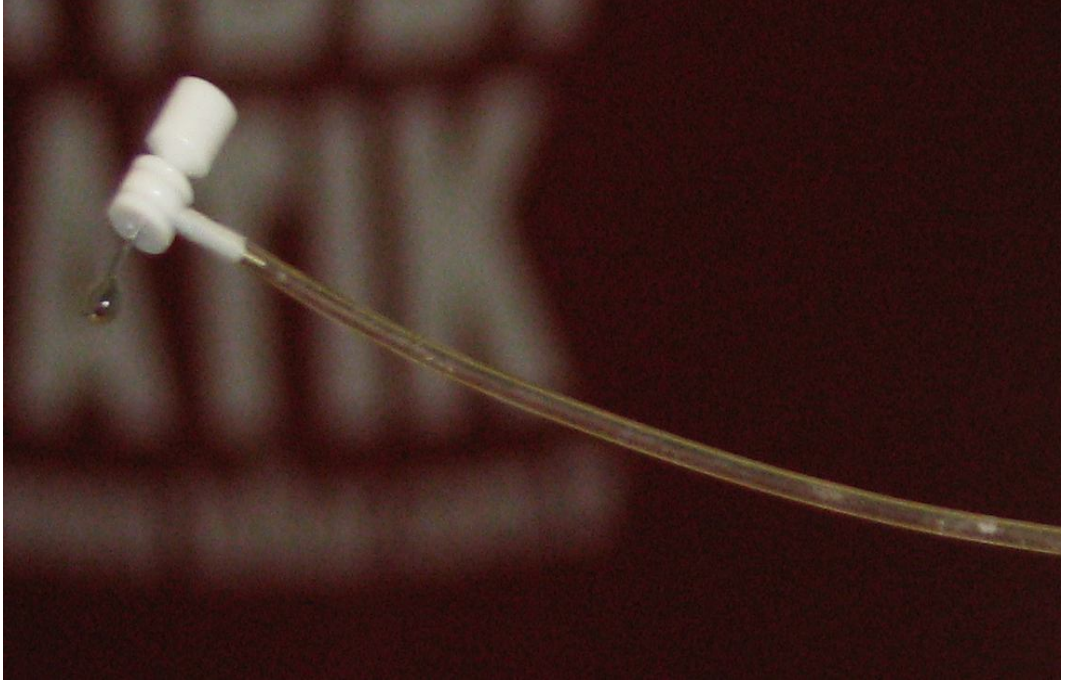
Ozmotik pompalar, pompa seti içerisinde birlikte gelen ucu künt özel bir iğne yardımıyla (kontrol grubu için yapay BOS, deney grupları için ise 1 ve 10 nmol apelin-13) dolduruldu ve infüzyon kitine bağlanacak olan metal kanüllü kapak parçası yerleştirildi.



Şekil 14. Ozmotik mini pompalar

3.2.3. Beyin infüzyon kitinin hazırlanması

Çalışma için sıçan lateral ventrikülüne enjeksiyon yapacak şekilde dizayn edilen beyin infüzyon kitleri (Alzet, ABD) kullanıldı. Kitlerle beraber gelen özel kanüller beyin infüzyon kitine şekil 15’de gösterildiği gibi takıldı ve içerisi infüze edilecek madellerle (kontrol için yapay BOS, deney grupları için 1 ve 10 nmol apelin-13) hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu.



Şekil 15. Beyin infüzyon kitinin görünüşü

İçerisi sıvı ile doldurulmuş olan kit ve kanül, kanülün serbest ucundan şekil 16'daki gibi ozmotik pompaya bağlandı.

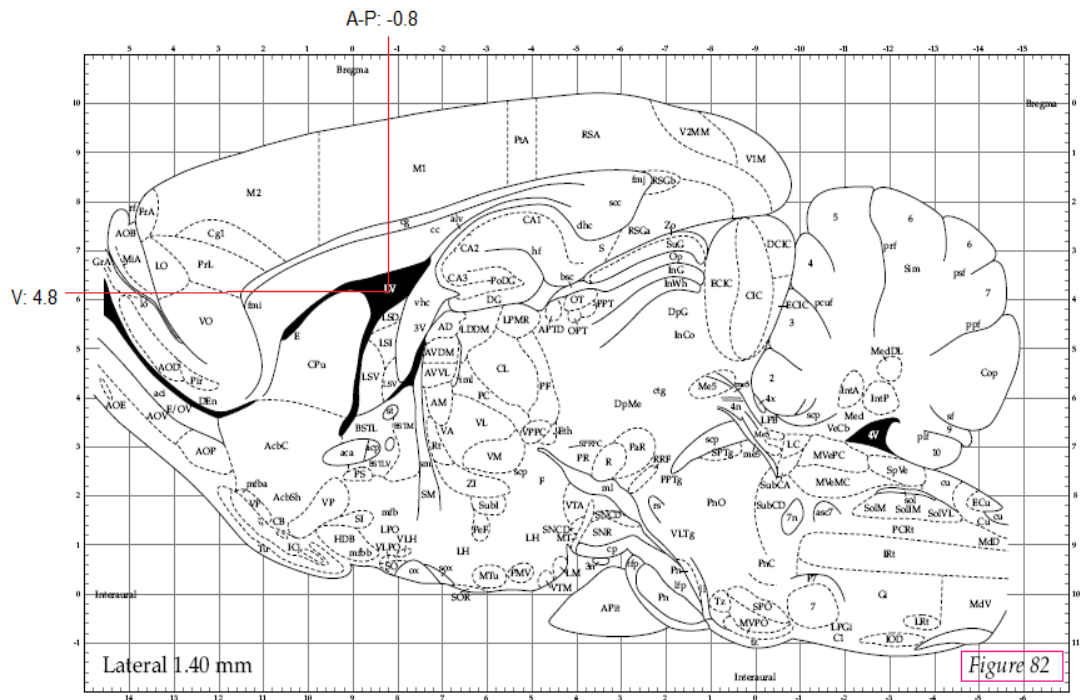


Şekil 16. Ozmotik pompa ve beyin infüzyon kitinin görünümü

3.2.4. Stereotaksi

3.2.4.1. Koordinatların belirlenmesi

Lateral ventrikülün stereotaksik koordinatları Paxinos & Watson sıçan beyin atlasına göre belirlendi (94). Lateral ventrikül giriş noktası, referans noktası olarak seçilen bregmadan 1,40 mm mediyal ve 0,8 mm posteriyör (kaudal) gidilerek tespit edildi (Şekil 17).



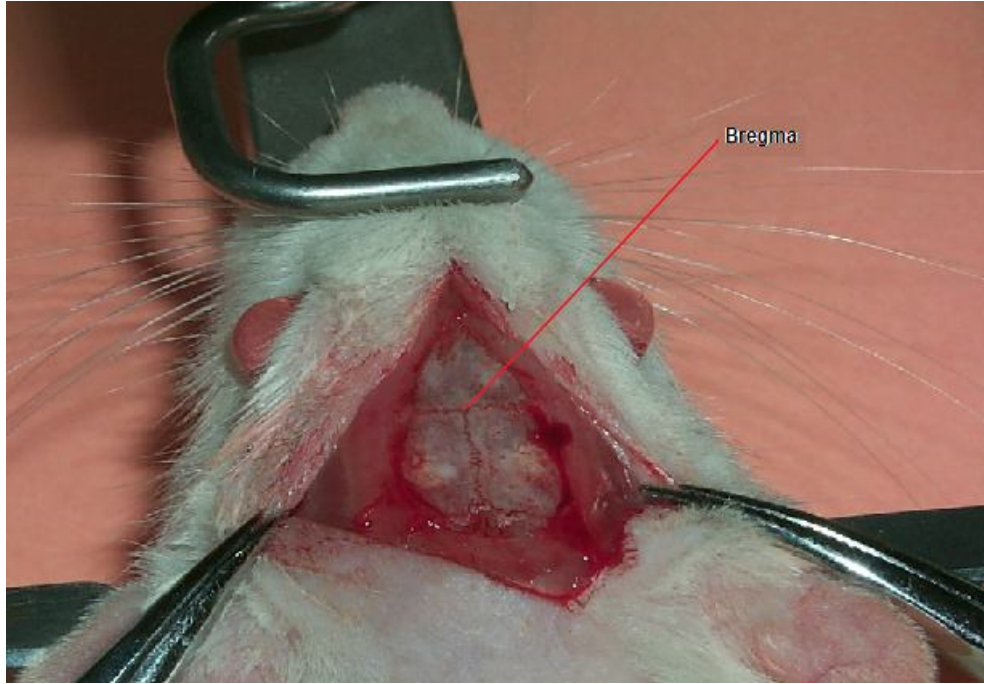
Şekil 17. Sıçan beyin atlasına göre lateral ventrikül koordinatları (94)

3.2.4.2. Hayvanların hazırlanması

Sıçanlar, intramüsküler olarak 75 mg/kg Ketamin (Richter pharma ag, Avustralya), 5 mg/kg xylazine (Alfazyne, Hollanda) ile anestezi edildiler. Sıçanların parmak kısırtma yanıtları ve fizyolojik yanıtın izlenmesi sonunda anestezi altına girdikleri saptandı ve spontan hareketleri kaybolan sıçanların kafa derileri tıraş edilerek operasyona hazır hale getirildi.

3.2.4.3. Hayvanların sterotaksik cihaza yerleştirilmesi

Hayvanlar stereotaksik cihaza kulaklarından ve ağız kısmından kafasının yüzeyi yere tam paralel olacak şekilde sabitlendiler (Rodent Stereotaxic Instruments, Harvard Apparatus, ABD). Kafatası derisi bir bistüri ile kesilerek kemik yapıya ulaşıldı ve kemik yüzeyi temizlenerek ve bregmanın açık bir şekilde görülmesi sağlandı (Şekil 18).

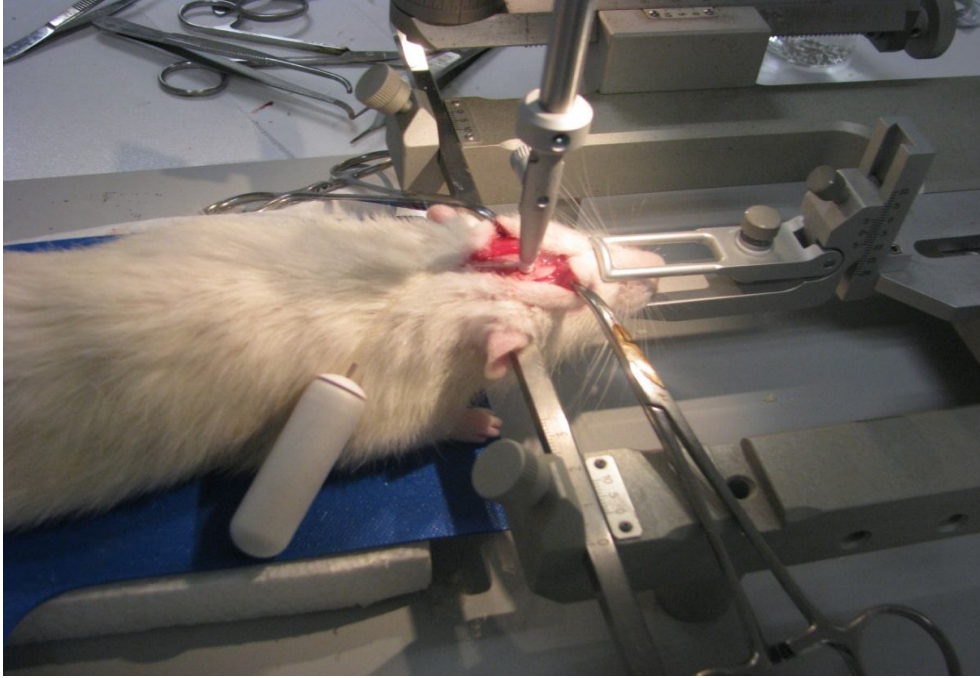


Şekil 18. Bregma noktasının görünüşü

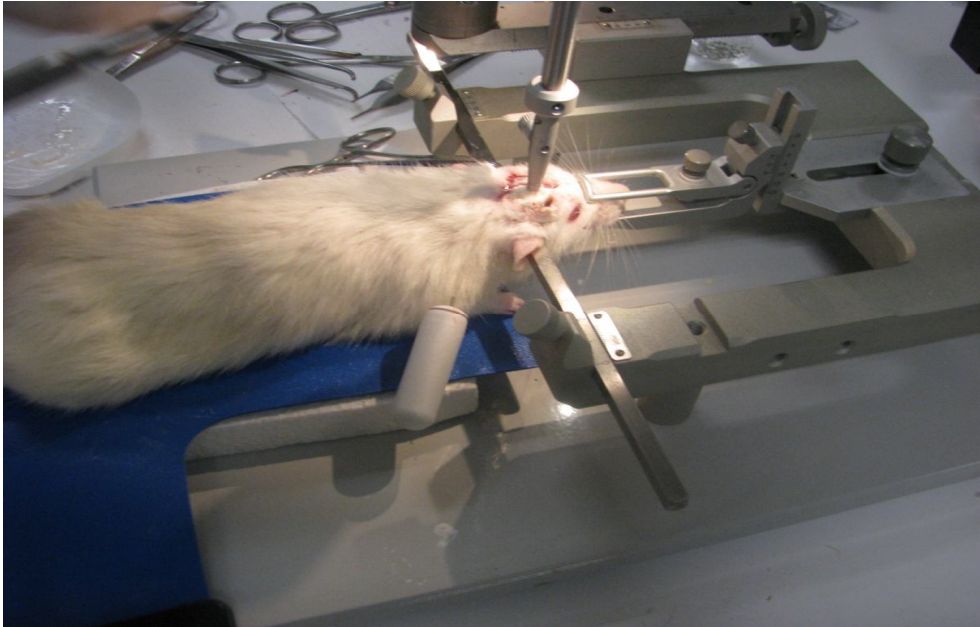
Referans noktası olarak kabul edilen bregmadan itibaren daha önceden belirlenen koordinatlara göre (mediyal 1.40, posteriyör 0.8 mm) kemiğin delinecek kısmı belirlendi ve işaretlendi. İşaretlenen nokta matkap ile duraya zarar vermeden delindi. Kalıcı kanül, beyin infüzyon kiti üzerindeki plastik tutma bölgesinden stereotaksik cihaza takılmış olan özel tutacağına yerleştirildi ve açılan delikten lateral ventriküle indirildi (Şekil 19).

Beyin infüzyon kitine bağlı olan ozmotik pompa sıçanların ense derisinin altına şekil 21A'da gösterildiği gibi yerleştirildi. İnsizyon bölgesi 3.0 ipek (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş. Trabzon/Türkiye) ile dikildi ve insizyon bölgesine %10

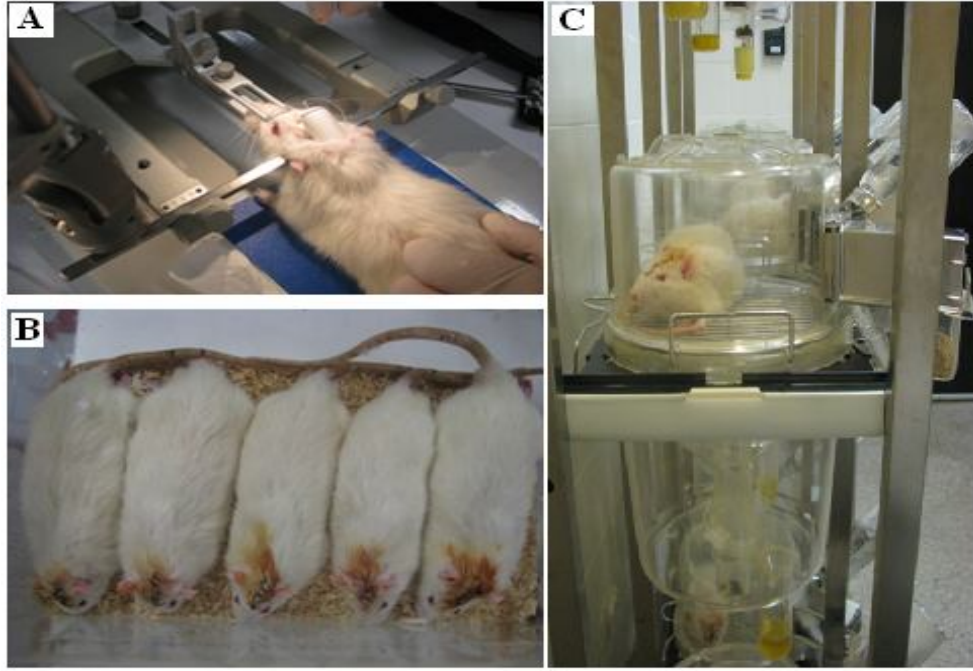
povidon iyodin sürüldü (Şekil 21B). Hayvanlar uyandıktan sonra bireysel olarak tutulacakları metabolik kafeslere alındı (Şekil 21C).



Şekil 19. Beyin infüzyon kitinin lateral ventriküle yerleştirilmesi



Şekil 20. Beyin infüzyon kitinin diş yapıştırıcısıyla kafatasına sabitlenmesi



Şekil 21. Sıçanların ense derisi altına ozmotik pompanın yerleştirilmesi (A), Ozmotik pompa yerleştirildikten sonra cerrahi bölgenin dikilmesi ve temizlenmesi (B), Hayvanların metabolik kafeslere alınması (C)

3.3. Hayvanların takibi ve deney protokollerinin uygulanması

Metabolik kafeslerde tutulan hayvanların yem ve su tüketimleri ile vücut ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler bir hafta süreyle her gün kaydedildi. Bu ölçümler her gün sabah 09.00-10.00 saatleri arasında yapıldı. 7. Günün sonunda sıçanlara spontan solunumları ve göz kırpmaya refleksi korunacak şekilde intramusküler olarak 75 mg/kg ketamin, 5 mg/kg xylazine ile anestezi uygulandı. Spontan hareketleri kaybolan sıçanlar sırt üstü pozisyonda masaya yatırıldı ve bacaklarından sabitlendiler (Şekil 22).



Şekil 22. Femoral kanülasyon için sıçanların sabitlenmesi

Sıçanların sağ arka bacaklarının iç kısmından bistüri ile bir insizyon yapılarak femoral vene (Şekil 23) ulaşıldı. Sıçanların femoral venlerine bir kateter (BD Neoflon 26 GA 0,6*19 mm 13 ml/min) yerleştirildi (Şekil 24) ve 2/0 ipek ile sabitlendi. Kateterler ve enjektörler (Hayat Tıbbi aletler A.Ş. İstanbul/Türkiye) kullanılmadan önce heparin (Neuparin Mustafa Nevzat İlaç Sanayi A.Ş. İstanbul/Türkiye) ile yıkandı. İlk kanın alındığı an 0. Dakika olarak kabul edildi ve takip eden 15 dakikada bir LH ve FSH analizleri için femoral venden kan alındı (Şekil 25). Bu işleme 90. dakikaya kadar devam edildi. 90. Her kan alımından sonra sıçanlara heparinli (%1) serum fizyolojik enjekte edildi. 90. dakika kan örnekleri alındıktan sonra hayvanlar dekapitasyonla öldürülüp testisleri çıkarıldı. Çıkarılan

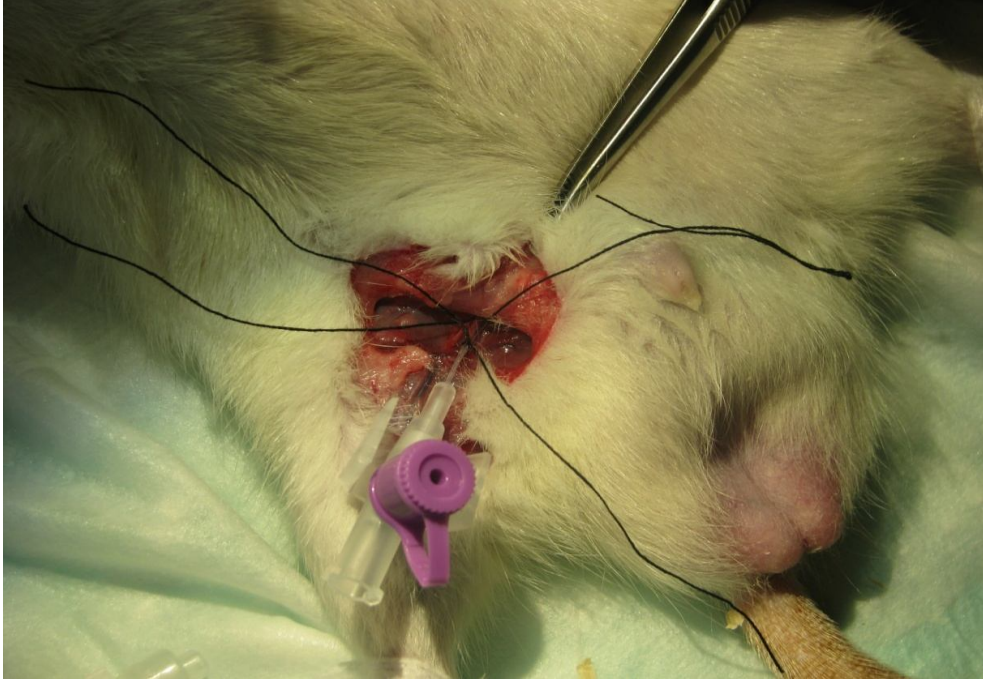
testisler tartıldı ve histolojik incelemel için %10 formaldehit bulunan kaplara konuldu.



Şekil 23. Femoral venin görünüşü

Alınan kanlar +4C°de 2000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj (Heraeus, Almanya) edildi ve ayrılan plazmalar kuru buzda dondurularak LH ve FSH analizleri için dondurucuya (Nuair, Japonya) bırakıldı. Dekapite edilen hayvanlardan alınan kanlardan elde edilen serum örnekleri de aynı şekilde kuru buzda dondurularak derin dondurucuya yerleştirildi.

Dekapitasyon sonrası sıçanların ense derisi altına yerleştirilen ozmotik pompalar çıkartıldı, pompa içerisinde kalan çözelti miktarı ölçülerek ozmotik pompaların düzgün bir şekilde çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.



Şekil 24. Femoral vene kateter takılması



Şekil 25. Femoral venden kan alınması

3.4. Analizlerin yapılması

3.4.1. Plazma LH ve FSH seviyelerinin belirlenmesi

Plazma LH ve FSH seviyeleri EIA (enzim immüno testi) yöntemi (95) ile belirlendi.

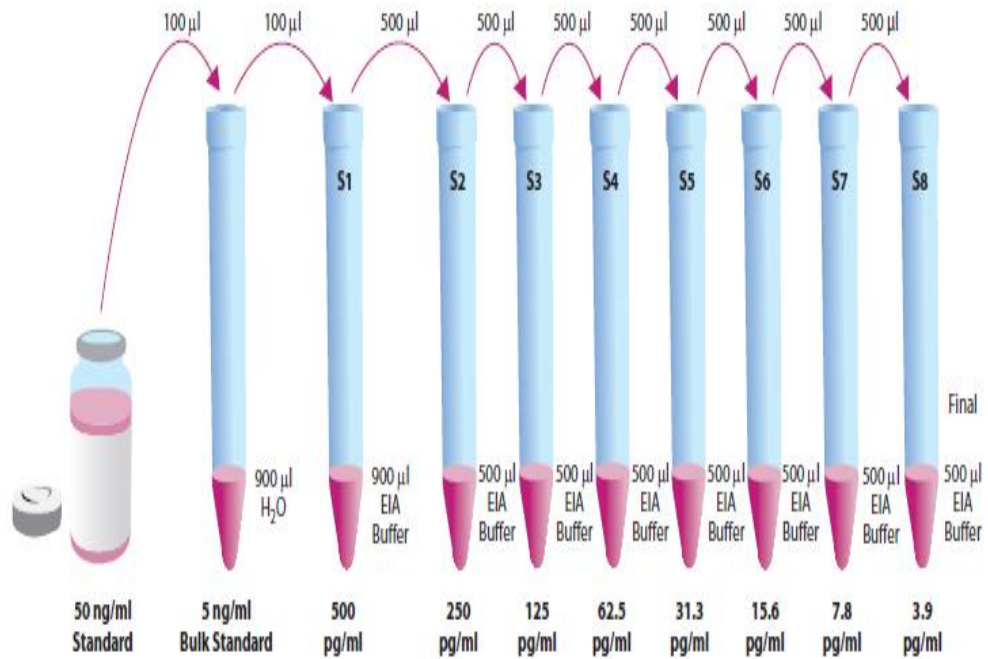
- Taşıyıcı bir plak içerisinde değişik oranlarda standart, numune ve kontroller
1. Antikor ile etüvde 37 °C’de bir saat süresince preinkübe edildi.
Antikor dilüsyonu (1:1000) 10 µl antikor / 1ml PBS
Sıçan LH için 100 µl antikor + 100 µl standart, numune, kontrol alındı.
Sıçan FSH için 100 µl antikor + 75 µl standart, numune, kontrol alındı.
- Bir saatlik inkübasyon sonrasında plaktaki standart, numune ve kontroller, daha önce LH ve FSH ile kaplanılan plağa transfer edildi.
- Plak, 4°C’de gün aşırı inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında plak yıkanarak döküldü.
- Kuyucuklara 100 µl biyotinlenmiş 2. Antikor (4ml biyotinlenmiş 2. antikor/1ml BSA karışımı) eklendi.
- Plak etüv içerisinde 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
- Plak tekrar yıkanarak döküldü.
- Kuyucuklara 100 µl streptavidin solüsyonu (4 µl streptavidin solüsyonu/1ml PBS karışımı) eklendi ve 15 dakika 4°C’de inkübe edildi.
- Plak tekrardan yıkanarak döküldü.
- Kuyucuklara 150 µl substrat solüsyonu (8 ml substrat A+ 8 ml substrat B karışımı) eklendi 40 dakika 24 °C’de inkübe edildi.
- Kuyucuklara H₂SO₄ eklenerek inkübasyon durduruldu.
- 450 nm’de ELISA cihazında (Bio-Rad, ABD) okundu.

3.4.2. Serum testosteron seviyesinin belirlenmesi

Serum testosteron seviyesini belirlemek için testosteron ELISA kiti (Cayman ABD) kullanıldı. Deneye başlamadan önce kit içinde bulunan 50 ng/ml konsantrasyona sahip standart;

1. Standart (S1) 500 pg/ml,
2. Standart (S1) 250 pg/ml
3. Standart (S1) 125 pg/ml,
4. Standart (S1) 62,5 pg/ml,
5. Standart (S1) 31,3 pg/ml,
6. Standart (S1) 15,6 pg/ml,
7. Standart (S1) 7,8 pg/ml,
8. Standart (S1) 3,9 pg/ml,

final konsatrasyonlara sahip olacak şekilde dilüe edildi (Şekil 26).



Şekil 26. ELISA testosteron kit standartının seri dilüsyonları

Hazırlanan standartlar, numuneler, ELISA tamponu, antikor ve Bo, ELISA Kit plağına şekil 27’de gösterildiği gibi pipetlendi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	Blk	Blk	Blk
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	Blk	Blk	Blk
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	Blk	Blk	Blk
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	Blk	Blk	Blk

Şekil 27. Testosteron kit çözeltilerin plaktaki bulunma düzeni

Kuyucuklara, kitte bulunan tampon ve çözeltiler Tablo 6’da gösterildiği şekilde pipetlendi.

Tablo 6. ELISA kit plakına yapılan pipetleme işlemi

Kuyucuk	EIA Tamponu	Standart/ Örnek	İşaretli hormon	Antikor
Blank (Blk)	-	-	-	-
Toplam aktivite	-	-	5µl	-
Non spesifik bağlanma	100 µl	-	50 µl	-
Bo	50 µl	-	50 µl	50 µl
Standart / Örnek	-	50 µl	50 µl	50 µl

- Daha sonra plak oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde 2 saat süresince inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında plak yıkama solüsyonu ile 5 dakika yıkandı ve kurutuldu.
- Her kuyucuğa Ellmann ayıracı eklendi.
- Sonrasında ise işaretli hormon sadece TA kuyucuklarına eklendi.
- Plak plastik film ile kaplanarak karanlık ortamda çalkalamalı inkübatör ile 60-90 dakika kadar tekrar inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında plak 405 nm dalga boyunda ELISA cihazında okundu.

3.4.3. Testis histolojisi

3-4 mm kalınlıkta alınan dokular %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat tespit edildi. 24 saat takip işleminin ardından alınan doku parçaları 24 saat boyunca akar çeşme suyu altında yıkandı. Yıkama işleminin ardından dokulara histolojik doku takip işlemi uygulanmıştır.

DOKU TAKİP İŞLEMİ:

%70 alkolde 1 saat

%70 alkolde 1 saat

%80 alkolde 1 saat

%80 alkolde 1 saat

%96 alkolde 1 saat

%96 alkolde 1 saat

Absolü alkolde 1 saat

Absolü alkolde 1 saat

Ksilende 1 saat

Ksilende 1 saat

Parafinde 2 saat

Parafinde 2 saat bekletildi.

Doku takibi tamamlandıktan sonra parafine gömülen dokulardan Leica RM2145 marka mikrotom ile 3-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik

yapıyı gözlemlemek için Mayers'in Hematoksilen-Eozin boya metodu uygulandı (96).

HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYA PROSEDÜRÜ:

Ksilen I.....	5 dakika
Ksilen II.....	5 dakika
Ksilen III.....	5 dakika
Absolü Alkol.....	3 dakika
%96 Alkol.....	3 dakika
%80 Alkol.....	3 dakika
%70 Alkol.....	3 dakika
Distile su.....	5-10 sn çalkalama
Hematoksilen.....	12-13 dakika
Çeşme suyu.....	25 dakika
Eozin.....	2 dakika
%96 Alkol.....	3 dakika
%96 Alkol.....	3 dakika
Absolü Alkol.....	3 dakika
Absolü Alkol.....	3 dakika
Ksilen I.....	5 dakika
Ksilen II.....	5 dakika
Ksilen II.....	5 dakika

Her testis için 100 seminifer tübül çapı ölçüldü (10'luk objektif kullanılarak). Leydig hücrelerini saymak için 20 farklı interstisiyel alan incelendi ve hücrelerin sayımı 100'lük objektif kullanılarak yapıldı.

Preparatlar Leica DFC280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win 1000 görüntü analiz sistemi ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

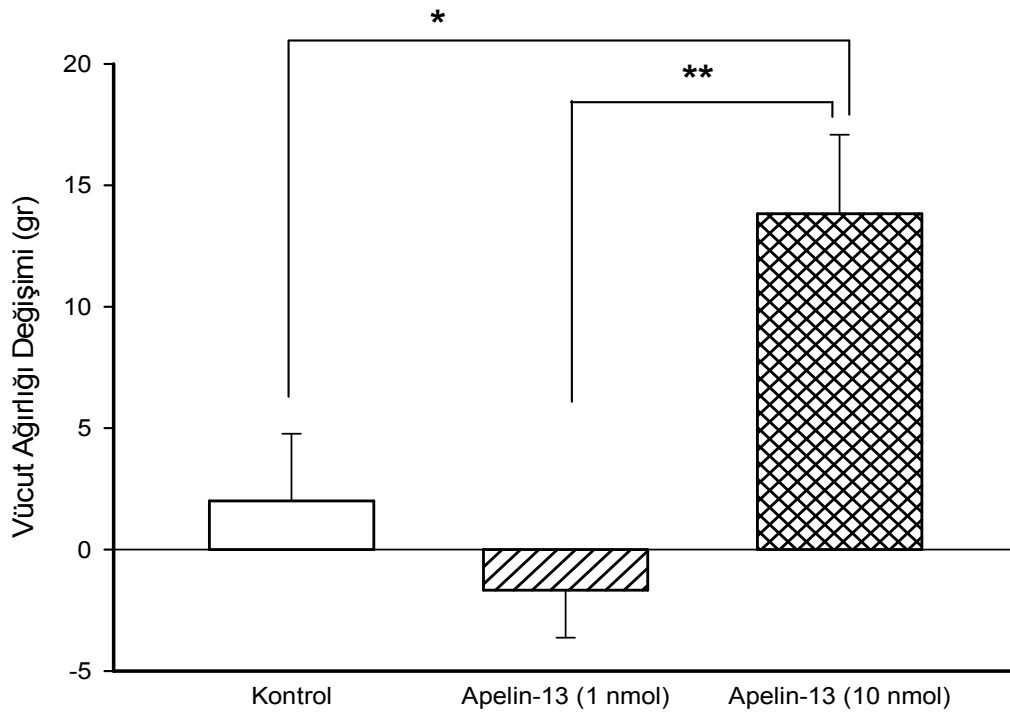
3.4.4. İstatiksel analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 12.0 for Windows paket programında yapıldı. Veriler Ortalama \pm standart hata şeklinde ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA post hoc tukey HSD ve Mann-Whitney *U* Post Hoc Bonferroni testleri kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Icv apelin-13 uygulanmasının vücut ağırlıkları üzerine etkileri

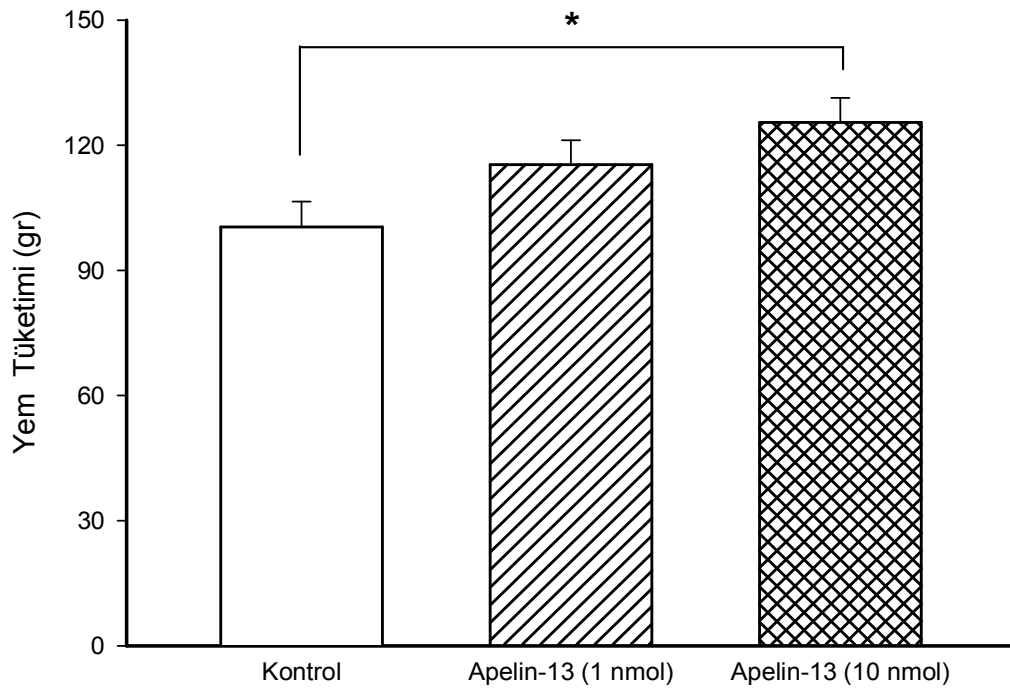
Apelin-13'ün farklı iki dozunun (1 ve 10 nmol) uygulaması sonrasında hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişimler Şekil 28'de verilmiştir. Yüksek doz apelin-13 uygulanan hayvanların vücut ağırlıkları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek bulunurken ($p<0.05$), düşük doz apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların vücut ağırlıklarındaki değişim kontrol grubuna göre anlamlı değildi. Apelin-13 uygulanan gruplar arasında yapılan kıyaslamada ise yüksek doz uygulanan gruptaki hayvanların vücut ağırlıkları düşük doz uygulanankinden istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek bulundu ($p<0.005$).



Şekil 28. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (* $p<0.05$, ** $p<0.005$; One-Way ANOVA Post Hoc Tukey HSD)

4.2. İcv apelin-13 uygulanmasının gıda alımı üzerine etkileri

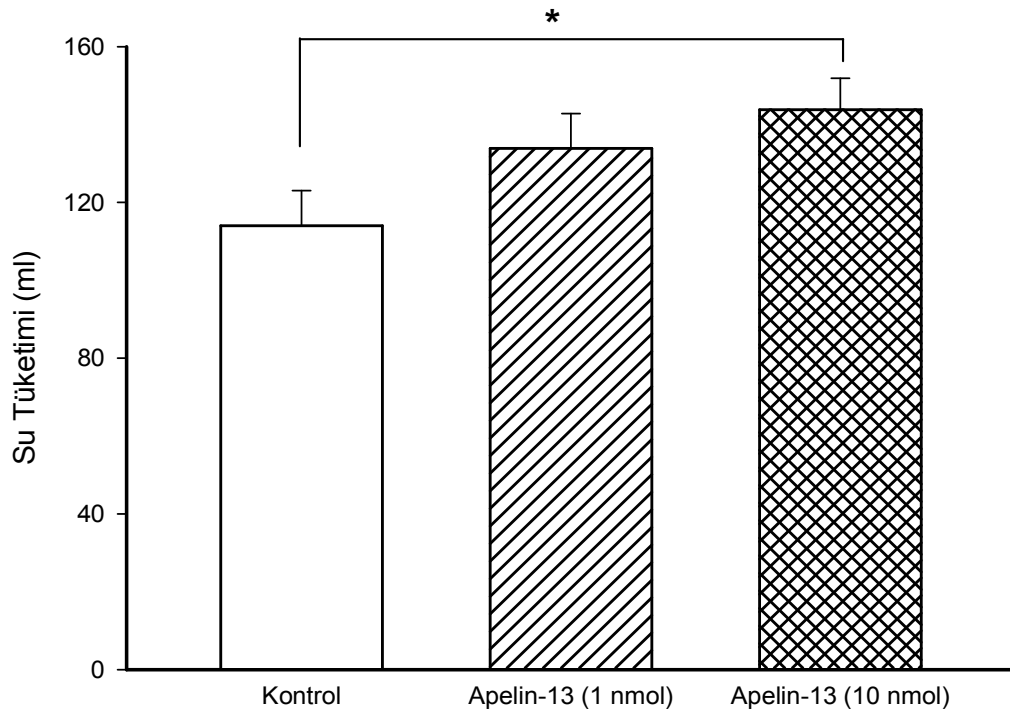
Apelin-13 uygulaması sonrasında hayvanların yem tüketimlerinde meydana gelen değişimler Şekil 29'da gösterilmiştir. Hem 1 hem de 10 nmol apelin-13 uygulanması hayvanların yem tüketiminde artışlara sebep oldu ancak yalnızca 10 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların yem tüketimleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).



Şekil 29. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların yem tüketimlerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (* $p<0.05$; One-Way ANOVA Post Hoc Tukey HSD)

4.3. İcv apelin-13 uygulanmasının su tüketimi üzerine etkileri

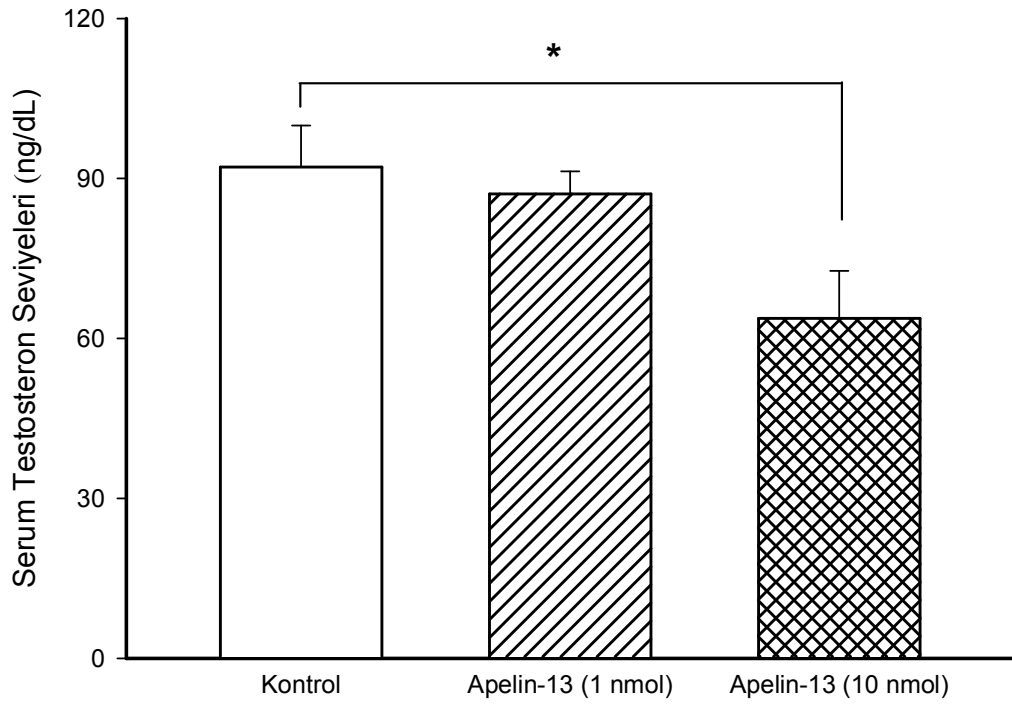
Yüksek doz apelin-13 uygulanması hayvanların su tüketiminde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirirken ($p<0.05$), 1 nmol apelin-13 uygulaması herhangi bir etkiye sebep olmadı (Şekil 30).



Şekil 30. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların su tüketimlerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (* $p < 0.05$; One-Way ANOVA Post Hoc Tukey HSD)

4.4. Icv apelin-13 uygulanmasının serum testosteron seviyeleri üzerine etkileri

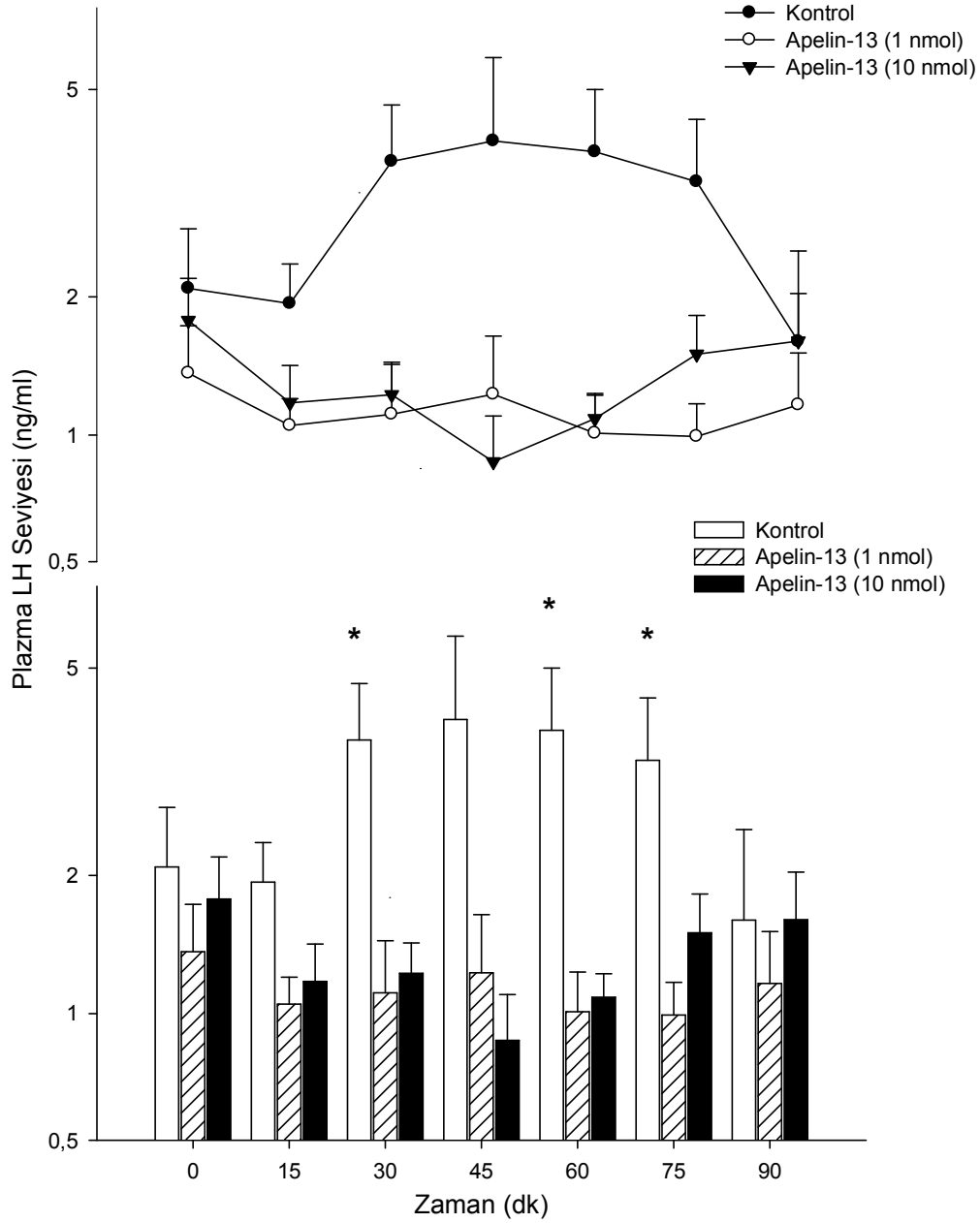
Yüksek doz apelin-13 ve düşük doz apelin-13 uygulanan hayvanların serum testosteron seviyelerinde meydana gelen değişimler Şekil 31’de verilmiştir. 10 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların serum testosteron düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük olarak bulundu ($p < 0.05$). 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların serum testosteron seviyelerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi. Apelin-13 uygulanan gruplar arasında yapılan kıyaslamada ise 10 nmol apelin-13 uygulanan grubun serum testosteron seviyeleri düşük doz uygulananakilerinden belirgin biçimde düşük olmasına karşın istatistiksel olarak bir anlam olmadığı belirlendi ($p = 0.07$).



Şekil 31. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların serum testosteron seviyelerinde meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (* $p < 0.05$; One-Way ANOVA Post Hoc Tukey HSD)

4.5. İcv apelin-13 uygulanmasının plazma LH salınımı üzerine etkileri

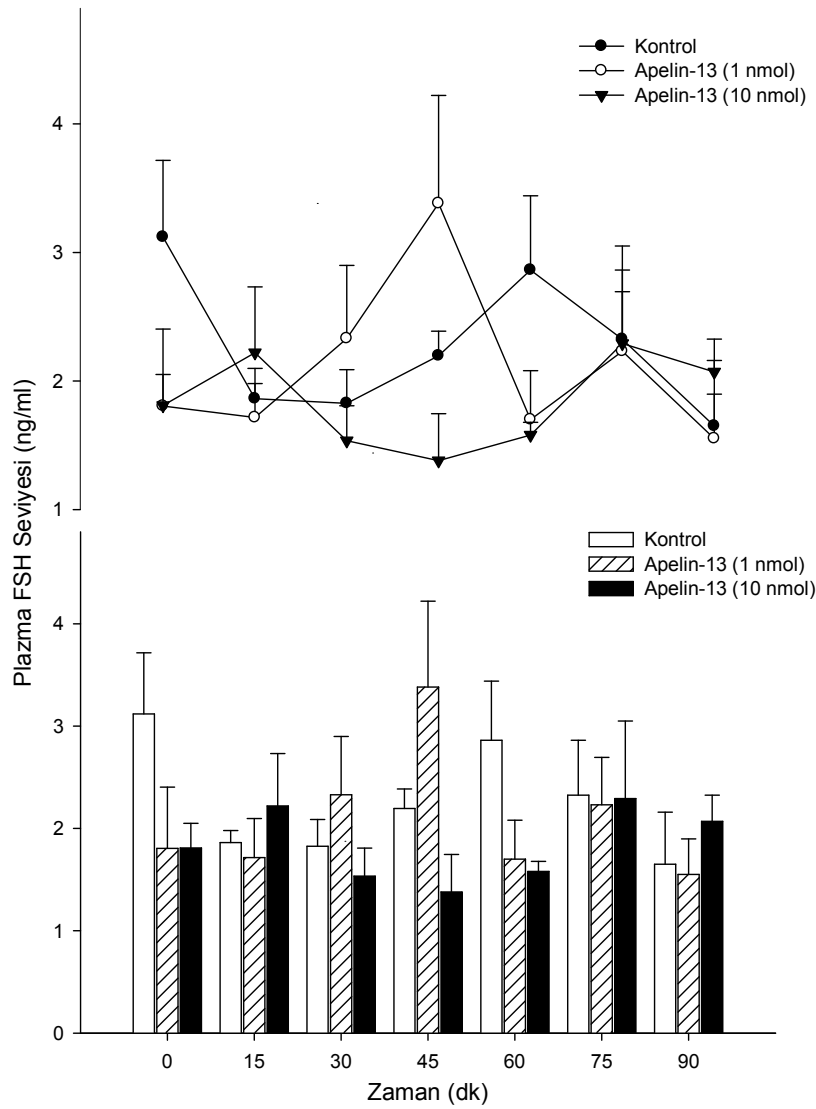
Apelin-13 uygulanan grupların zamana bağlı olarak 90 dakika süreli LH salınım profillerinde meydana gelen değişimler Şekil 32’de gösterilmiştir. Apelin-13’ün farklı iki dozunun (1 ve 10 nmol) uygulandığı grupların LH salınımında meydana gelen değişimler kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm zaman aralıklarında kontrol grubu diğerlerinden daha yüksek olduğu ancak baskılanmanın sadece 30, 60 ve 75. dakikalarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).



Şekil 32. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların plazma LH salınımlarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (* $p < 0.05$; One-Way ANOVA Post Hoc Tukey HSD)

4.6. İcv apelin-13 uygulanmasının plazma FSH salınımı üzerine etkileri

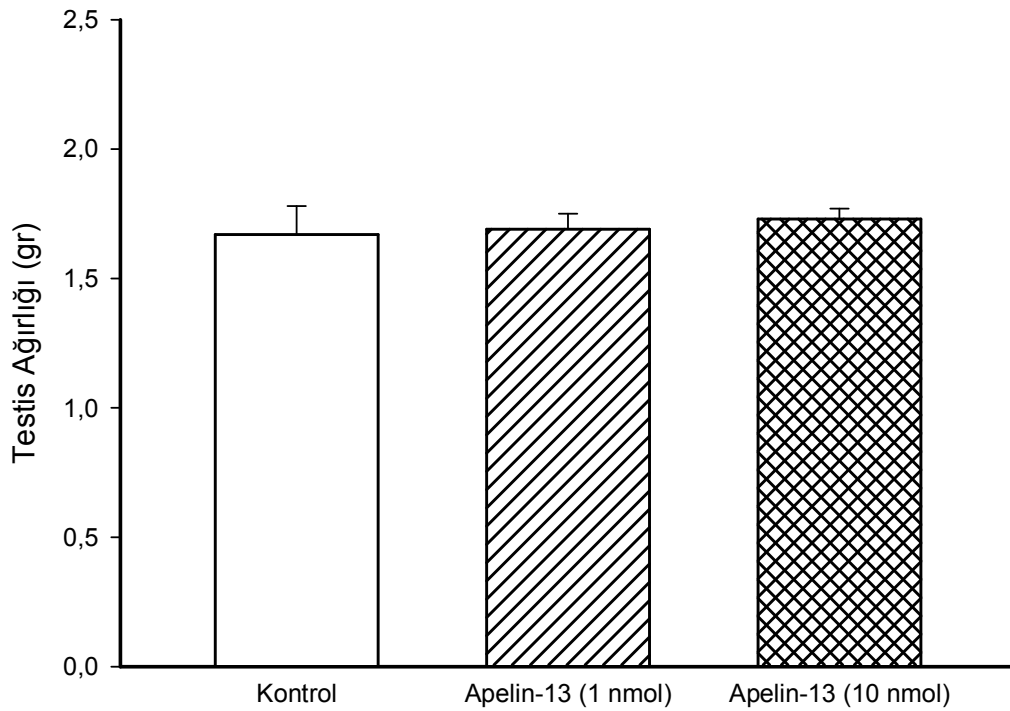
10 nmol apelin-13 ve 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90'ncı dakikalardaki plazma FSH seviyesinde meydana gelen değişimler, Şekil 33'de sunulmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda gruplar arasında plazma FSH seviyeleri bakımından anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlendi.



Şekil 33. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların plazma FSH salınımlarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (One-Way ANOVA Post Hoc Tukey HSD)

4.7. İcv apelin-13 uygulanmasının testis ağırlıkları üzerine etkileri

10 nmol apelin-13 ve 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların testis ağırlıklarında meydana gelen değişimler Şekil 34’da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda ne yüksek doz ne de düşük doz apelin-13 uygulanmasının grupların testis ağırlıklarında anlamlı bir değişim meydana getirmediği gözlenmiştir.



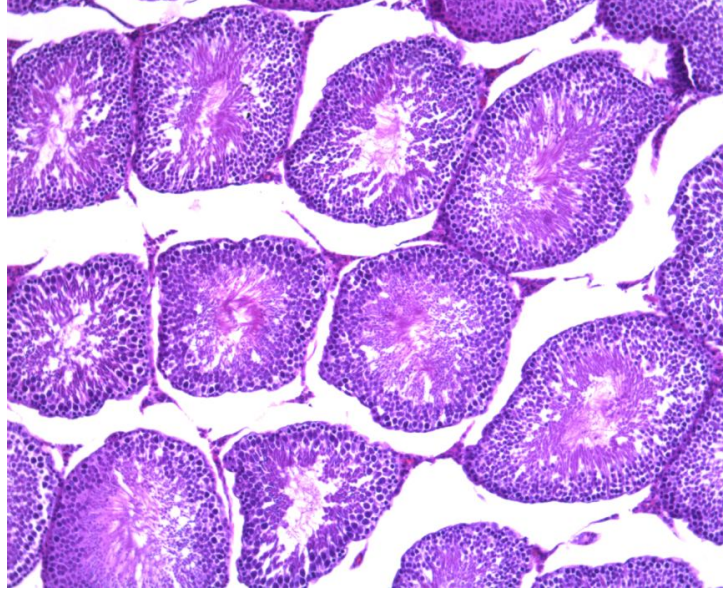
Şekil 34. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların testis ağırlıklarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler

4.8. Histolojik inceleme

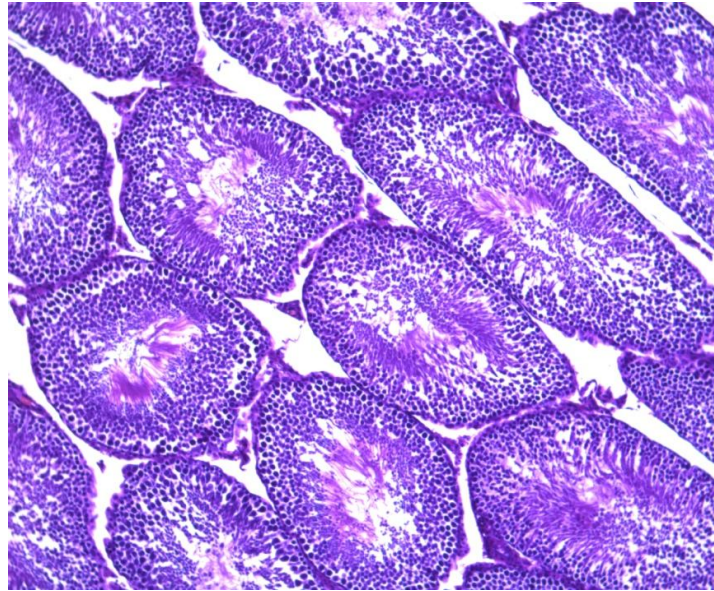
4.8.1. İcv apelin-13 uygulanmasının seminifer tübüller üzerine etkileri

Bütün gruplarda seminifer tübüllerin çoğu histolojik olarak normal görünümdeydi (Şekil 35, 36, 37). Tübüllerin epitelinde gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin lümenlerinde ise spermatozoonlar izlendi. Bazı tübüllerde

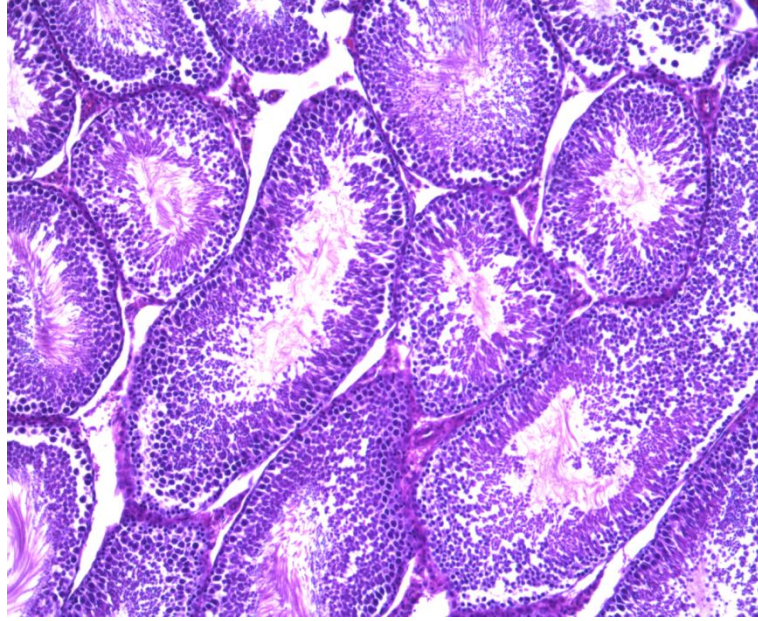
ise spermatogjenik hücre organizasyon bozuklukları ve hafif tübüler değişiklikler olduğu tespit edildi.



Şekil 35. Kontrol grubundaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (H-E X10)

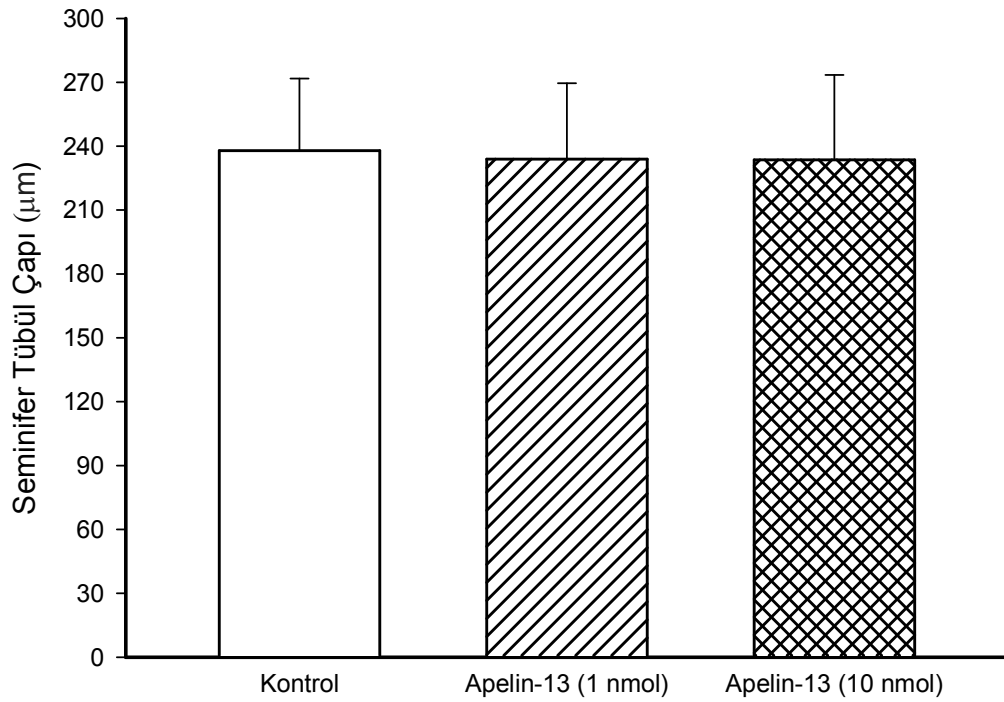


Şekil 36. 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (H-E X10)



Şekil 37. 10 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların seminifer tübüllerinin görünüşü (H-E X10)

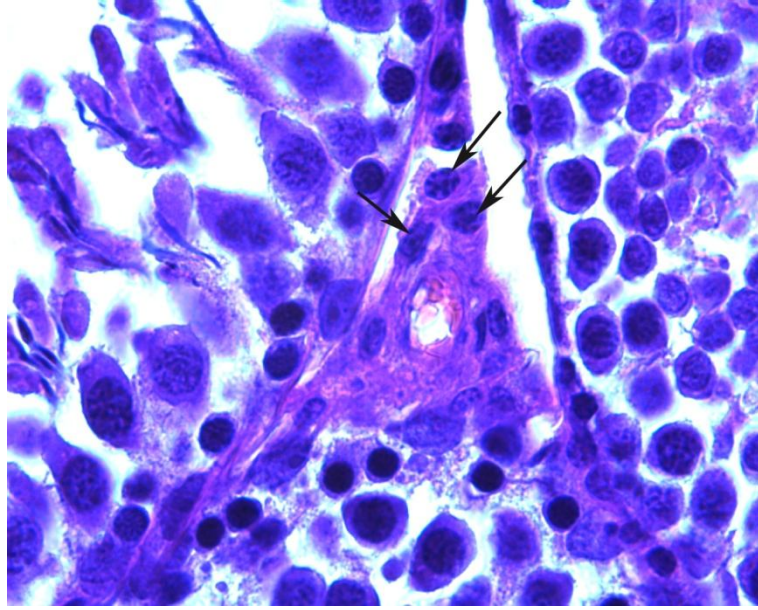
Testis dokusunun histolojik incelenmesinde ve seminifer tübül çaplarının ölçümünde, apelin-13 uygulanan grupların seminifer tübüllerin çaplarının benzer olduğu ve kontrol grubuna göre hafif bir azalma meydana geldiği görüldü. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 38).



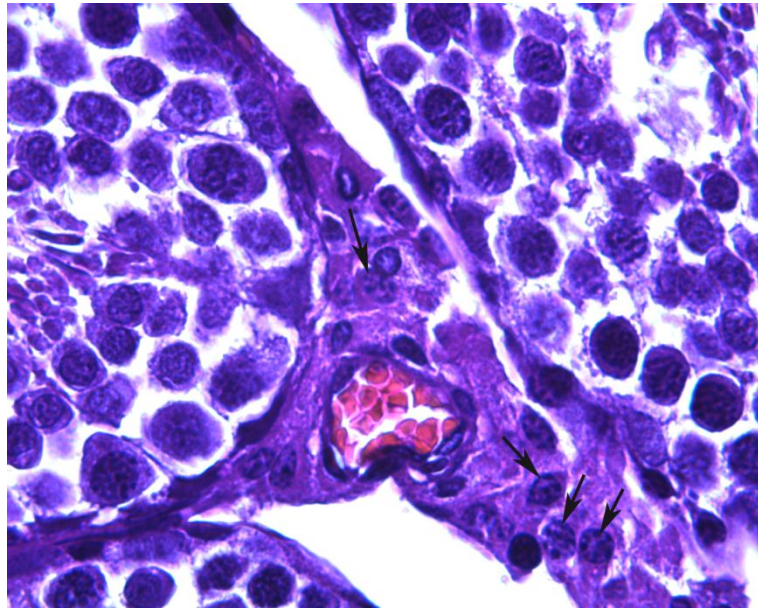
Şekil 38. Apelin-13 uygulamasından sonra seminifer tübül çaplarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler

4.8.2. İcv apelin-13 uygulanmasının Leydig hücreleri üzerine etkileri

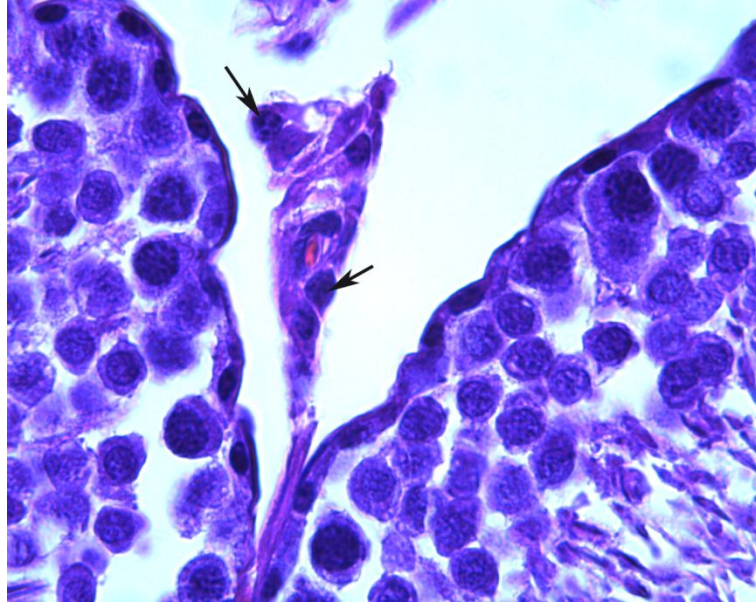
Yapılan incelemede Leydig hücrelerinin seminifer tübüllerin arasında ve kapiller damarlara yakın lokalize oldukları izlendi. Bu hücrelerde yuvarlak ökromatik nükleuslar içerisinde kromatin, küçük parçacıklar halinde nükleolemmaya yakın olarak yerleşmişti. Leydig hücrelerinin histolojik yapısı ve görünümünün bütün gruplarda benzer olduğu görüldü ancak 10 nmol apelin-13 uygulanan grupta Leydig hücre sayısının azalmış olduğu belirlendi (Şekil 39, 40, 41). Germinatif epitelin hücreleri olan spermatogonia, spermatozoid ve spermatidlerin daha az etkilendiği de tespit edildi.



Şekil 39. Kontrol grubundaki hayvanların Leydig hücrelerinin görünüşü. Leydig hücreleri (oklarla gösterilen) kapiller damarların yakınında yerleşmiş ve nükleer zarfın iç kısmında dikkat çekici tarzda yoğun kromatin izlenmekte (H-E X100)

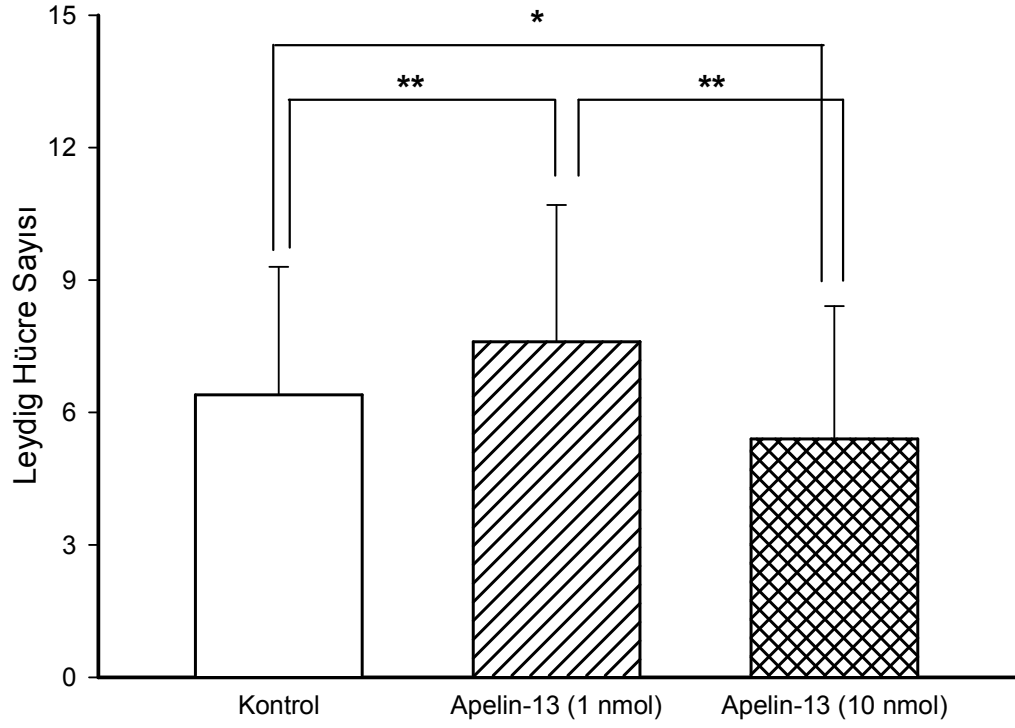


Şekil 40. 1 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların Leydig hücrelerinin görünüşü (oklarla gösterilen; H-E X100)



Şekil 41. 10 nmol apelin-13 uygulanan gruptaki hayvanların Leydig hücrelerinin görünüşü (oklarla gösterilen; H-E X100)

Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde, yüksek doz apelin-13 uygulanan grupun Leydig hücre sayısında kontrol ve düşük doz uygulanan gruba göre belirgin bir azalma olduğu belirlendi (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.005$). 1 nmol apelin-13 uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Leydig hücre sayısının kontrole göre anlamlı biçimde artmış olduğu tespit edildi ($p < 0.005$; Şekil 42).



Şekil 42. Apelin-13 uygulamasından sonra hayvanların Leydig hücre sayılarında meydana gelen (Ort±SH) değişiklikler (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$; Mann-Whitney U Post Hoc Bonferroni test)

5.TARTIŞMA

5.1. Apelin-13'ün vücut ağırlığı, gıda alımı ve su tüketimi üzerine etkileri

Gıda alımının kontrolünde hipotalamus iştah merkezi olarak önemli bir rol oynamaktadır (97). İnsan ve hayvanlarda ventromedial hipotalamusun tokluk, lateral hipotalamusun ise açlık sinyallerini alan merkez olduğu bilinmektedir. PVN lezyonları obezite ile sonuçlanırken, lateral hipotalamik alan lezyonları düşük vücut kilosunu korumaya yönelik olarak anoreksi ile sonuçlanır (98). Kilo kaybına yanıt olarak lateral hipotalamik alan nöronları uygun şekilde aktive edilir ve beraberinde PVN nöronlarından anoreksijenik sinyal iletiminde meydana gelen azalmayla birlikte gıda alımı artar. Apelin ve APJ'nin, birçok hipotalamik nükleusta (özellikle SON ve PVN) eksprese edildiği belirlenmiş; apelinin gıda alımı, su tüketimi (10,18) ve enerjinin düzenlenmesi gibi fonksiyonel rollerinin olduğu gösterilmiştir (10,15). Obez bireylerde plazma apelin seviyesinin yüksek olması (51,55), PVN ve SON gibi gıda alımının düzenlenmesinde rol oynayan hipotalamik alanlarda da apelin ve reseptörünün yüksek oranda bulunması, apelinin beslenme davranışı üzerine rollerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Apelinin gıda alımı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmaların sonuçları arasında tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Valle A. ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada lateral ventriküle kronik olarak apelin-13 infüzyonu yapılan sıçanların gıda alımında ve vücut ağırlıklarında artış olduğu gösterilmiştir (99). O'shea ve ark. lateral ventriküle 10 nmol apelin-12 uygulaması sonrasında, gıda alımının arttığını ve bu artışın da özellikle gece meydana geldiğini belirlemişlerdir (100). Yapılan bir başka çalışmada ise yem kısıtlaması yapılan ve normal beslenmesine devam eden sıçanlara, 1 ve 3 nmol dozlarında icv apelin-13 uygulaması yapılmış ve 24 saatlik periyotta hayvanların gıda alımında azalmalar olduğu gözlenmiştir (52).

Bu çalışmada, sıçanlara 7 gün süre ile icv olarak 1 ve 10 nmol apelin-13 (10 µl/saat) infüzyonu yapıldı. Yüksek doz apelin-13 infüzyonu, hayvanların hem yem tüketimlerinde hem de vücut ağırlıklarında artışlar meydana getirirken, düşük doz (1 nmol) uygulanması bu parametreler üzerinde herhangi bir değişime neden olmadı. Elde edilen veriler apelinin, merkezi olarak uygulanmasının iştahı artırdığını ve bu

etkisinin de uygulanan doza bağılı olarak ortaya çıktığını gösterdi. ARN nöronları leptin sinyallerini PVN ve LHA'ya ulaştırarak bu nöron grupları arasındaki koordinasyonu sağlar (98). İcv uygulanan apelinin, leptinin etkisini baskılaması muhtemel mekanizmalardan bir tanesidir. Bu nedenle yapılacak olan leptin analizleri bu sorunun yanıtını net olarak ortaya koyabilecektir.

Susama ve su içme davranışlarını denetleyen nöronal sistem beynin hipotalamik bölgesinde yer alır. Vücut sıvı homeostazisinin düzenlenmesi hassas bir şekilde ozmoreseptörlerce nöral yolla yapılır (101). Hipotalamusun SON ve PVN'lerinin ADH sentezinden sorumlu olması, ozmoreseptörlerin AV3V bölgesinin ve SON'lerin yakın alanlarında yerleşim göstermesi (102) ve ayrıca bu hipotalamik alanlarda apelin/APJ sisteminin varlığı (18) su tüketimi üzerine apelinin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Apelinin sıvı alımı üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmaların sonuçları da birbirinden farklı yönleri işaret etmektedir. Taheri ve ark. yaptıkları bir çalışmada sıçanlara icv olarak farklı dozlarda apelin-13 (3, 10, 30 nmol) uygulamışlar ve sonrasında 24 saatlik periyotta 10 ve 30 nmol uygulanan grupların su tüketiminin arttırdığını belirlemişlerdir (45). Bunun aksine Reaux ve ark. 24 saat sıvı kısıtlaması yapılan sıçanlarda merkezi yolla uygulanan apelin-13'ün su alımını azalttığını ancak sıvı kısıtlaması yapılmayan hayvanlarda herhangi bir etki oluşmadığını bildirmişlerdir (9).

Yaptığımız çalışmada yüksek doz (10 nmol) apelin uygulanan gruptaki hayvanların su tüketiminde önemli düzeyde artış görülmesine rağmen düşük doz (1 nmol) uygulanan grupta kontrole göre bir farklılık ortaya çıkmadı. İki gün su kısıtlaması yapılan farelere apelin-17 verilmesi (9) ve anestezi ile uyutulmamış sıçanlara da icv olarak apelin-13 uygulanmasının (45) plazma ADH seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Apelinin hipotalamustaki etki alanlarından bir tanesinin SON olduğu düşünülürse, vücut su dengesi üzerine apelinin etkilerinin olması sürpriz değildir. Ancak etki mekanizmasını açıklamak için ileri seviyelerde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Etki mekanizma nasıl olursa olsun apelinin gıda ve su alımı ile ilgili olarak hipotalamik düzeyde önemli rollere sahip olduğu çalışmadan elde edilen net sonuçlardan bir tanesidir.

5.2. Apelin-13'ün plazma LH, FSH ve serum testosteron seviyeleri üzerine etkisi

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 (103). 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 (70). Ön hipofizin LH salgısı, testislerdeki Leydig hücreleri üzerinden testosteron salınımını gerçekleştirmektedir (104). Leydig hücrelerinden salınarak dolaşıma katılan testosteron negatif geri bildirim mekanizması ile GnRH salınımını durdurabilmektedir (105). GnRH etkisiyle ön hipofizde salınan bir diğer gonadotropin olan FSH'nin ise testislerdeki sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezi başlattığı bilinmektedir (106).

Apelin ve APJ'nin, GnRH'nin salındığı beyin bölgelerinde (özellikle SON, PVN gibi), insan, sıçan ve fare testisleri ile ovaryum gibi üreme yapılarında yoğun olarak bulunması, üreme sistemi üzerinde apelinin önemli etkilere sahip olabileceğini ve bazı reproduktif süreçlerin apelin ve APJ aracılığıyla düzenlenebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, apelin-13 uygulanan grupların LH salınımlarının tüm örnekleme zamanlarında kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ancak bu baskılanmanın istatistiksel olarak sadece 30, 60 ve 75. dakikalarda anlamlı olduğu belirlendi. Paralel olarak, yüksek doz apelin-13 uygulanan grubun serum testosteron seviyelerinin de anlamlı biçimde düşük olduğu tespit edildi. Plazma FSH seviyelerinde ise hiçbir zaman aralığında gruplar arasında farklılık gözlenmedi. Literatürde apelinin uzun süreli infüzyonu ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmayıp, mevcut çalışma bu bakımdan ilk olma özelliği taşımaktadır. Ancak sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada icv yolla (tek enjeksiyon) farklı dozlarda (3, 10, 30 nmol) apelin-13 uygulaması sonrası, 10 nmol apelin-13 uygulanan grupta plazma LH ve FSH

seviyesinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu rapor edilmiştir (45). Plazma LH seviyesi bakımından bu çalışmanın bulgularıyla bizim sonuçlarımız benzerlik gösterse de uygulamanın tek seferde yapılması ve LH analizlerinin tek bir zamanda alınan kan örneklerinden elde edilmesi, özellikle LH salınımının pulsatil doğasına çok uygun görünmemektedir. Bu çalışmadaki plazma FSH seviyeleri ile bizim bulgularımız arasında farklılıklar vardır. Yine burada da apelinin uygulanma süresi ve deney takip süresi arasındaki farklılıklar bu sonucun ortaya çıkmasının esas sebeplerindendir. Hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenin son parçasını oluşturan testislerin histolojik incelemeleri sonucunda, yüksek doz apelin uygulanan grubun Leydig hücre sayılarının azalmış olduğu (1 nmol apelin-13 uygulanan grup hariç), spermatogenez basamakları ve seminifer tübül çapları bakımından ise gruplar arasında herhangi bir farklılık olmadığı belirlendi. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, hipotalamustan GnRH salgısı ve LH uyarısının kesilmesinin, Leydig hücrelerinin hacminin azalmasına ve testosteron üretiminin durmasına sebep olduğu gösterilmiştir (107,108). Apelinin doz bağımlı olarak Leydig hücre sayılarında ve testosteron seviyelerinde meydana getirdiği azalmaya seminifer tübül çapları ve spermatogenez basamaklarının eşlik etmemesi, apelinin testisler üzerine doğrudan bir etkisinden ziyade LH salınımında meydana getirdiği baskılanmanın bir sonucu olduğunu düşünmemize sebep oldu.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Apelin-13 uygulamasının doz bağımlı olarak gıda alımında, su tüketiminde ve vücut ağırlığında artışlara sebep olması apelin-13'ün iştah ve su dengesinin düzenlenmesinde önemli bir oyuncu olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu etkilerin merkezi olarak ortaya çıkması ARN, SON, PVN gibi hipotalamik alanlarda daha önceki çalışmalarda gösterilen reseptörler üzerinden etkilerini ortaya koyduğu görüşünü desteklemektedir. Apelinin iştah artırıcı ve kilo alımını tetikleyici bu etkilerinin antagonize edilmesi esasına dayanan farmakolojik ajanların geliştirilmesi obezite ile mücadeleye yeni bir boyut kazandırabilecektir. Ayrıca ileri dönemlerde özellikle iştah mekanizmasının düzenlenmesinde rollerinin olduğu bilinen leptin, ghrelin ve nöropeptid Y gibi hormonlarla apelinin ilişkisini ortaya koyan çalışmaların yapılması bu hususta var olan soru işaretlerinin sayısının azalmasını sağlayacaktır.

Apelinin üreme eksenini üzerine etki ederek LH salınımı, Leydig hücre sayısı ve testosteron seviyelerinde azalmaya sebep olması yanında, FSH salınımı, testis ağırlıkları, seminifer tübül yapıları ve spermatogenez basamakları üzerine etki göstermemesi hipotalamik bir LH salgılatıcı faktörünün baskılanması ya da LH inhibe edici bir faktörün salınımının artmasıyla meydana gelmiş gibi görünmektedir. Apelinin üreme fonksiyonları üzerine oluşturduğu baskılayıcı etkiler LH salgısının azalmasının bir sonucudur.

Çalışmadan elde edilen bulgular, apelinin hem gıda alımını artırıcı hem de üreme fonksiyonlarını baskılayıcı etkisinin periferik olmaktan ziyade merkezi olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. (2005). Yağ Dokusu Endokrin Bir Organ midir? *Dicle Tıp Dergisi*, 32 (4), 211-217.
2. Gimble, J.M. (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 3 (5), 705-713.
3. Vazquez-Vela, M., Torres, N., Tovar, A. (2008). White adipose tissue as an endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*, 39 (8), 715-728.
4. Susan, E., Eldo, E., Frezza, D. (2008). Adipose tissue: a new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*, 12, 287-295.
5. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Fujino, M. (1998). Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251 (2), 471-476.
6. Hinuma, S., Onda, H., Fujino, M. (1999). The quest for novel bioactive peptides utilizing orphan seven-transmembrane-domain receptors. *J. Mol. Med.*, 77 (6), 495-504.
7. Todisco, A., Campbell, V., Dickinson, C.J., DelVallem, J., Yamada, T. (1994). Molecular basis for somatostatin action: inhibition of c-fos expression and AP-1 binding. *Am. J. Physiol.*, 267 (2), 245-253.
8. Katugampola, S., Davenport, A. (2003). Emerging roles for orphan G protein coupled receptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*, 24 (1), 30-35.
9. Reaux, A., Mota, N.D., Skultetyova, I., Lenkei, Z., Messari, S., Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C. (2001). Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.*, 77 (4), 1085-1096.
10. Xie, H., Yuan, LQ., Luo, XH., Huang, J., Cui, RR., Guo, LJ., Zhou, HD., Wu, XP., Liao, EY. (2007). Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis*, 12 (1), 247-254.

11. Tang, SY., Xie, H., Yuan, LQ., Luo, XH., Huang, J., Cui, RR., Zhou, HD., Wu, XP., Liao, EY. (2007). Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. *Peptides*, 28 (3), 708-718.
12. Choe, H., Farzan, M., Konkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L. (1998). The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 72 (7), 6113– 6118.
13. Cayabyab, M., Hinuma, S., Farzan, M., Choe, H., Fukusumi, S., Kitada, C. (2000). Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, 74 (24), 11972–11976.
14. Puffer, B. A., Sharron, M., Coughlan, C. M., Baribaud, F., McManus, C. M., Lee, B. (2000). Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology*, 276 (2), 435– 444.
15. O'Carroll, A.M., Selby, T.L., Palkovits, M., Lolait, S.J. (2000). Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1492 (1), 72– 80.
16. Reaux, A., Gallatz, K., Palkovits, M., Llorens-Cortes, C. (2002). Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience*, 113 (3), 653–662.
17. Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R., O'Dowd, B.F. (2000). Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J. Neurochem.*, 74 (1), 34-41.
18. Brailoiu, G.C., Dun, S.L., Yang, J., Ohsawa, M., Chang, J.K., Dun, N.J. (2002). Apelin immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary. *Neurosci. Lett.*, 327 (3), 193-197.
19. Kleinz, MJ., Davenport, A.P. (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics*, 107 (2), 198–211.

20. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 136 (1-2), 355-360.
21. Malyszko, J., Malyszko, JS., Kozminski, P., Mysliwiec, M. (2006). Apelin and cardiac function in hemodialyzed patients: possible relations? *Am J Nephrol*, 26 (2), 121-126.
22. Ladeiras-Lopes, R., Ferreira-Martins, J., Leite-Moreira, AF. (2008). The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arq Bras Cardiol.*, 90 (5), 343-349.
23. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. (2001). Molecular properties of apelin: Tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 1538 (2-3), 162-171.
24. Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., Fujino, M. (1999). Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta*, 1452 (1), 25-35.
25. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M. (2000). Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J. Biol. Chem.*, 275 (28), 21061-21067.
26. Falco, M. D., De Luca, L., Onori, N., Cavallotti, I., Artigiano, F., Esposito, V., De Luca, B., Laforgia, V., Groeger, AM., De Luca, A. (2002). Apelin expression in normal human tissues. *In Vivo.*, 16 (5), 333-336.
27. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., Fujimiya, M. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 15, 99 (2-3), 87-92.

28. Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., Audigier, Y. (1999). Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the Mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev.*, 84 (1–2), 199–203.
29. Edinger, A. L., Hoffman, T. L., Sharron, M., Lee, B., Yi, Y., Choe, W. (1998). An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 72 (10), 7934–7940.
30. Choe, W., Albright, A., Sulcove, J., Jaffer, S., Hesselgesser, J., Lavi, E. (2000). Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol*, 6 (1), 61–69.
31. Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., Davenport, A. P. (2001). [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br J Pharmacol*, 132 (6), 1255–1260.
32. Saint-Geniez, M., Argence, C. B., Knibiehler, B., Audigier, Y. (2003). The msr/apj gene encoding the apelin receptor is an early and specific marker of the venous phenotype in the retinal vasculature. *Gene Expr Patterns*, 3 (4), 467–472.
33. Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y. (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem*, 84 (5), 1162–1172.
34. Földes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Lives, M., Lindstedt, K.A. (2003). Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 308 (3), 480-485.
35. O'Donnell, LA., Agrawal, A., Sabnekar, P., Dichter, MA., Lynch, DR., Kolson, DL. (2007). Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J Neurochem*, 102 (6), 1905-1917.

36. Falcão-Pires, I., Leite-Moreira, AF., *Rev Port Cardiol.* (2005). Apelin: a novel neurohumoral modulator of the cardiovascular system. Pathophysiologic importance and potential use as a therapeutic target. *Rev Port Cardiol*, 24 (10), 1263-1276.
37. Charles, CJ., Rademaker, MT., Richards, AM. (2006). Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep. *Journal of Endocrinology*, 189 (3), 701–710.
38. Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., et al. (2004). Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem* 279 (25), 26274–26279.
39. Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllyla, S., Ilves, M., Tokola, H. (2002). Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*, 91 (5), 434–440.
40. Kagiya, S., Fukuhara, M., Matsumura, K., Lin, Y., Fujii, K., Iida, M. (2005). Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept.*, 125 (1-3), 55-59.
41. Hashimoto, T., Kihara, M., Ishida, J., Imai, N., Yoshida, S., Toya, Y., Fukamizu, A., Kitamura, H., Umemura, S. (2006). Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 26 (6), 1267-1272.
42. Zhong, JC., Huang, DY., Liu, GF., Jin, HY., Yang, YM., Li, YF., Song, XH., Du, K. (2005). Effects of all-trans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.*, 65 (3), 743-750.
43. Gurzu, B., Petrescu, BC., Costuleanu, M., Petrescu, G. (2006). Interactions between apelin and angiotensin II on rat portal vein. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, 7 (4), 212-216.

44. O'Carroll, AM., Lolait, SJ. (2003). Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *J Neuroendocrinol.*, 15 (7), 661-666.
45. Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillon, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatei, M., Bloom, S.R. (2002). The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291 (5), 1208-1212.
46. Tobin, VA., Bull, PM., Arunachalam, S., O'Carroll, AM., Ueta, Y., Ludwig, M. (2008). The effects of apelin on the electrical activity of hypothalamic magnocellular vasopressin and oxytocin neurons and somatodendritic Peptide release. *Endocrinology*, 149 (12), 6136-6145.
47. Wang, G., Anini, Y., Wei, W., Qi, X., Carroll, AM., Mochizuki, T., Wang, HQ., Hellmich, MR., Englander, EW., Greeley, GH. (2004). Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology*, 145 (3), 1342-1348.
48. Lambrecht, NW., Yakubov, I., Scott, D., Sachs, G. (2005). Identification of the K⁺ efflux channel coupled to the gastric H-K-ATPase during acid secretion. *Physiol Genomics*, 21 (1), 81-91.
49. Sörhede, W.M., Magnusson, C., Ahrén, B. (2005). The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept*, 131 (1-3), 12-17.
50. Wang, G., Kundu, R., Han, S., Qi, X., Englander, EW., Quertermous, T., Greeley, GH. (2009). Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul. Pept.*, 158 (1-3), 32-39.

51. Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpéné, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, JS., Valet, P. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, *146* (4), 1764–1771.
52. Sunter, D., Hewson, AK., Dickson, SL. (2003). Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett*, *353* (1), 1-4.
53. Carpe, C., Dray, C., Attane, C., Valet, P., Portillo, M.P., Churrua, I., Milagro, F.I., and Castan-Laurell, I. (2007). Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *J. Physiol. Biochem.*, *63* (4), 359–373.
54. Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., Yoshimatsu, H. (2007). Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*, *148* (6), 2690-2697.
55. Heinonen, MV., Purhonen, AK., Miettinen, P., Paakkonen, M., Pirinen, E., Alhava, E. (2005). Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept.*, *130* (1-2), 7-13.
56. Lee, DK., George, SR., O'Dowd, BF. (2006). Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol Sci.*, *27* (4), 190-194.
57. Shimizu, T., Kosaka, N., Murayama, C., Tetsuka, M., Miyamoto, A. (2009). Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation. *Anim Reprod Sci.*, *116* (1-2), 28-37.
58. Malamitsi-Puchner, A., Gourgiotis, D., Boutsikou, M., Baka, S., Hassiakos, D., Briana, DD. (2007). Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term. *ActaPaediatrica*, *96* (12), 1751–1754.
59. Arıncı, K., Elhan, A. (2001). *Anatomi*. Ankara: Güneş kitapevi

60. Gen bilim. Erişim: 04 Nisan 2011, [http://www.genbilim.com/content /view/291036/33/](http://www.genbilim.com/content/view/291036/33/)
61. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2000). Principles of Neural Science United States of America: McGraw-Hill Companies.
62. Guyton, AC. (2006) Tıbbi Fizyoloji (H. Çavuşoğlu, B. Ç. Yeğen). İstanbul : Yüce Yayın evli & Nobel Tıp Kitapevi (2006).
63. Rago, R., Salacone, P. (2008). Hypothalamus-hypophysis-testicle axis. *Journal of Andrological Sciences*, 15 (1), 13-17.
64. Reece, W.O. (2008). Dukes Veteriner Fizyoloji (S. Yıldız, Çev.). Malatya : Medipres Yayıncılık (2004).
65. Molina, EP. (2004). Endocrine Physiology. United States of America: McGraw-Hill Companies.
66. Knobil, E. (1990). The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol*. 163 (5 Pt 2), 1721-1727.
67. Levine, J.E., Pau, K.Y.F., Ramirez, V.D. and Jackson, G.L. (1982). Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology*, 111 (5), 1449–1455.
68. Urbanski, HF., Ojeda, SR. (1987). Activation of luteinizing hormone-releasing hormone release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology*, 46 (3), 273–276.
69. Yingdong, Ni., Yuchuan, Z., Lizhi, L., Roland, G., Ruqian, Z. (2007). Developmental changes of FSH-R, LH-R and GnRH-I expression in the ovary of prepubertal ducks (*Anas platyrhynchos*). *Anim. Reprod. Sci.*, 100 (3-4), 318– 328.
70. Clarke, I.J. and Cummins, J.T. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111 (5), 1737–1739.

71. Levine, J.E. and Ramirez, V.D. (1982). Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology*, *111* (5), 1439–1448.
72. Gambacciani, M., Liu, J.H., Swartz, W.H. *et al.* (1987). Intrinsic pulsatility of luteinizing hormone release from the human pituitary in vitro. *Neuroendocrinology*, *45* (5), 402–406.
73. Veldhuis, J.D., Johnson, M.L. and Dufau, M.L. (1987). Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low-dose exogenous GnRH pulses in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *64* (6), 1275–1282.
74. Learn Genetics. Erişim: 16 Nisan 2011, http://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/genetics/images/brains_large.jpg
75. Dingman, JF. (1971). Pituitary function. *N Engl J Med.*, *285* (11), 617-9
76. Koepfen, BM., Stanton, BA. (2008). Berne & Levy Physiology. Philadelphia: Mosby Elsevier
77. Karsch, F.J., Moenter, S.M., Caraty, A. (1992). The neuroendocrin signal for ovulation. *Anim. Reprod., Sci.* *28*, 329–341.
78. Ellis, G.B., Desjardins, C., Fraser, H.M. (1983). Control of pulsatile LH release in male rats. *Neuroendocrinology*, *37* (3), 177–183.
79. McLaughlin, D., Stamford, J., White, D. (2007). İnsan Fizyolojisi (Abdurrahman Aktümsek, Çev.). İstanbul : Nobel Yayın evi. (2010).
80. El-Gehani, F., Tena-Sempere, M., Huhtaniemi, I. (1998). Vasoactive intestinal peptide is an important endocrine regulatory factor of fetal rat testicular steroidogenesis. *Endocrinology*, *139* (4), 1474-1480.
81. Dr. Alper Mumcu. Erişim: 3 Mayıs 2011 <http://www.mumcu.com/html/article.php?sid=367>
82. Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D.L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr. Rev.*, *23* (2), 141–174

83. Stocco, D.M., Clark, B.J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev.*, 17 (3), 221–244.
84. Kraemer, WJ., Loebel, CC., Volek, JS., Ratamess, NA., Newton, RU., Wickham, RB. (2001). The effect of heavy resistance exercise on the circadian rhythm of salivary testosterone in man. *Eur J Appl. Physiol.*, 84 (1-2), 13-18
85. Zitzmann, M., Nieschlag, E. (2001). Testosterone levels in healthy men and the relation to behavioural and physical characteristics: facts and constructs. *Eur J Endocrinol*, 144 (3), 183-97
86. Harman, S.M., Metter, E.J., Tobin, J.D., Pearson, J., Blackman, M.R. (2001). Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men, Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J. Endocrinol. Metab.*, 86 (2), 724–731.
87. Huhtaniemi, I.T., Korenbrot, C.C., Jaffe, R.B. (1977). HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44 (5), 963–96
88. Haider, S.G. (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.*, 233, 181–241.
89. Gen bilim. Erişim: 21 Şubat 2011, <http://www.genbilim.com/content/view/291036/33/>
90. Himas-Hagen, J. (1997). Technical comments: On raising energy expenditure in ob/ob mice. *Science*, 276 (5315), 1132-1133
91. Prino, JB., O’Rahilly, S. (1997). Regulation of adipose cell number in man. *Clinical Science*, 92 (1), 311
92. Morley, JE. (1987). Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocrine Reviews*, 8 (3), 256-287
93. Alzet. Erişim: 11 Mart 2011, http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html

94. Paxinos G, Watson C: (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, New York: Academic Press,
95. Pappa, A., Seferiadis, K., Marselos, M., Tsolas, O., Messinis, IE. (1999). Development and application of competitive ELISA assays for rat LH and FSH. *Theriogenology*, 51 (5), 911-926.
96. Bancroft, J.D., Stevers, A. (1990). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone
97. Diéguez, C., Vazquez, MJ., Romero, A., López, M., Nogueiras, R. (2011). Hypothalamic Control of Lipid Metabolism: Focus on Leptin, Ghrelin and Melanocortins. *Neuroendocrinology*. PMID: 21576929
98. Aslan, K., Serdar, Z., Tokullugil, H. A. (2004). Multifonksiyonel Hormon: Leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30 (2), 113-118,
99. Valle, A., Hoggard, N., Adams, AC., Roca, P., Speakman, JR. (2008). Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J Neuroendocrinol.*, 20 (1), 79-84.
100. O'Shea, M., Hansen, MJ., Tatemoto, K., Morris, MJ. (2003). Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci*, 6 (3), 163-167.
101. Bourque, CW., Oliet, SH. (1997). Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 59, 601–619.
102. Miselis, R.R. (1981). The efferent projections of the subfornical organ of the rat: A circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res*, 230 (1-2), 1–23.
103. Colledge, WH., Mei, H., d'Anglemont de Tassigny, X. (2010). Mouse models to study the central regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol.*, 324 (1-2), 12-18

104. Veldhuis, J.D., King, J.C., Urban, R.J. *et al.* (1987b). Operating characteristics of the male hypothalamo–pituitary–gonadal axis: pulsatile release of testosterone and follicle-stimulating hormone and their temporal coupling with luteinizing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65 (5), 929–941.
105. Foresta, C., Bordon, P., Rossato, M., Mioni, R., Veldhuis, J. D. (1997). 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. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82 (9), 3040-3046.
106. Bergendahl, M., Evans, WS., Veldhuis, JD. (1996). Current concepts on ultradian rhythms of luteinizing hormone secretion in the human. *Hum Reprod Update.*, 2 (6), 507-518.
107. Veldhuis, J.D. (1991). The hypothalamic–pituitary–testicular axis. In Yen, S.S.C. and Jaffe, R.B. (eds), *Reproductive Endocrinology*, 409–451.
108. Keeney, DS. (1990). Reversal of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *J Endocrinol* 127 (1), 47- 53



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

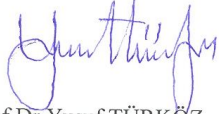

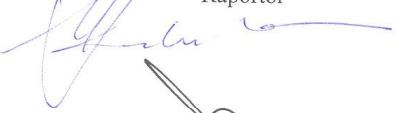
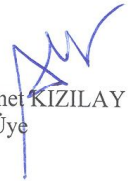

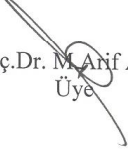


TIP FAKÜLTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 22-06-2010
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
 Araştırma Protokol no.su : 2010/52
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar-Albino
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 21 adet
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 4-6 aylık/ 220-280 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Süleyman SANDAL'ın yürütücüsü olduğu "Erkek Sıçanlarda İntraserebroventriküler Apelin Uygulamasının Hipotalamus- Hipofiz-Gonadal Eksen Üzerindeki Etkileri" isimli 2010/52 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

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

 Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ Başkan	 Doç. Dr. Abdurrahman KARAMAN Başkan Yard. katılmadı	 Yrd. Doç. Dr. Mustafa KARAKAPLAN Raportör
 Prof. Dr. Ahmet KIZILAY Üye	 Prof. Dr. Selim DOĞANAY Üye	 Yrd. Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ Üye
 Vet. Hek. M. Zafer BOZDAĞ Üye	 Salih AVCI Sivil Üye katılmadı	

ÖZGEÇMİŞ

06.07.1985 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Malatya'da tamamladım. 2005 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden, 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl, güz döneminde, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. 2010 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.