

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**



**ASPROSİN HORMONUNUN NÖROENDOKRİN
ETKİLERİNİN HİPOTALAMİK HÜCRE
HATLARINDA İN VİTRO YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
AYSUN ÜÇER
2023**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof Dr. Mete ÖZCAN
Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mete ÖZCAN

Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU

Doç. Dr. Suat TEKİN



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Aysun ÜÇER

02.06.2023

Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU

Biyofizik Anabilim Dalı

ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım süresince, engin akademik deneyim ve bilimsel birikimiyle yardım ve desteklerini esirgemeyen, her zaman sabır ve hoşgörüle yaklaşan değerli danışman hocam Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İhsan SERHATLIOĞLU' na, teşekkürü bir borç bilirim.

Araştırmalarım süresince her türlü akademik yardım ve desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR' a, her zaman desteğini üzerimde hissettiğim Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sinan CANPOLAT' a, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mete ÖZCAN' a, Sayın Doç. Dr. Emine KAÇAR' a sonsuz teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve her zaman manevi desteklerini esirgemeyen başta ailem ve Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Eda ÇOBAN ERCAN olmak üzere, Biyofizik ve Fizyoloji bölüm asistanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde 220S744 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TUBİTAK' a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Puberte Fizyolojisi.....	5
3.1.1. Puberteyi Etkileyen Faktörler.....	5
3.1.2. Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal Aks.....	6
3.1.3. GnRH	7
3.1.4. GnIH.....	9
3.1.5. Kisspeptin.....	9
3.2. Asprosin Hormonu	10
3.3. Asprosin ve Üreme İlişkisi	14
3.4. Çalışmanın Amacı	16
4. GEREÇ VE YÖNTEM	17
4.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması	17
4.2. Asprosin Uygulamasının GnRH Sekresyonuna Etkisinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi.....	18
4.3. GnIH Sekresyon Ölçümü	22
4.3.1. Asprosin Uygulamasının GnIH Sekresyonuna Etkisinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	22
4.4. Kisspeptin Sekresyon Ölçümü	27

4.4.1. Asprosin Uygulamasının Kisspeptin Sekresyonuna Etkisinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi	27
4.5. İstatistiksel Analiz	31
5. BULGULAR.....	32
5.1. GnRH Salgılayan Hücre Hatlarında Asprosinin Doz ve Zamana Göre Değişimi	32
5.1. GnIH Salgılayan Hücre Hatlarında Asprosinin Doz ve Zamana Göre Değişimi	34
5.2. Kisspeptin Salgılayan Hücre Hatlarında Asprosinin Doz ve Zamana Göre Değişimi	36
6. TARTIŞMA.....	38
7. KAYNAKLAR	41
8. ÖZGEÇMİŞ	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	Hipotalamus - Hipofiz – Gonadal Aksı.....	7
Şekil 2:	Asprosin hormonun merkezi ve periferik sistem üzerindeki etki mekanizması.....	12
Şekil 3:	GnRH salgılayan hücre hatlarına asprosin 1 nM doz uygulaması	18
Şekil 4:	GnRH salgılayan hücre hatlarına asprosin 10 nM ve 100 nM doz uygulaması	19
Şekil 5:	GnRH ölçümünde standart solüsyonunun ELISA protokolüne uygun bir şekilde dilüe edilmesi.....	20
Şekil 6:	GnRH sekresyon ölçümünde kit plağının düzeni.....	21
Şekil 7:	GnIH salgılayan hücre hatlarına asprosin 1 nM doz uygulaması.....	23
Şekil 8:	GnIH salgılayan hücre hatlarına asprosin 10 nM ve 100 nM doz uygulaması	23
Şekil 9:	GnIH sekresyon ölçümünde standart solüsyonunun ELISA protokolüne uygun bir şekilde dilüe edilmesi.	25
Şekil 10:	GnIH sekresyon ölçümünde kit plağının düzeni.....	25
Şekil 11:	Kisspeptin salgılayan hücre hatlarına asprosin 1 nM doz uygulaması.	28
Şekil 12:	Kisspeptin salgılayan hücre hatlarına asprosin 10 nM ve 100 nM doz uygulaması.	28
Şekil 13:	Kisspeptin ölçümünde standart solüsyonunun ELISA protokolüne uygun bir şekilde dilüe edilmesi.....	29
Şekil 14:	Kisspeptin sekresyon ölçümünde kit plağının düzeni.....	30
Şekil 15:	mHypoA GFP hücre hattında asprosin uygulamasının GnRH sekresyon seviyesine etkileri.....	33
Şekil 16:	mHypoA50 hücre hattında asprosin uygulamasının GnIH sekresyon seviyesine etkileri.....	35
Şekil 17:	mHypoA GFP3 hücre hattında asprosin uygulamasının Kisspeptin sekresyon seviyesine etkileri.....	37

KISALTMALAR LİSTESİ

AgRP	: Oreksijenik agouti ile ilişkili peptit
ARC	: Arkuat çekirdek
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBN1	: Fibrilin 1
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GLUT	: Glikoz taşıyıcıları
Gn	: Gonadotropin
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GnIH	: Gonadotropin İnhibe Edici Hormon
GPCR	: G protein-bağlı reseptör
HP	: Hipotalamo-hipofiz
ID	: İnsülin Direnci
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LH	: Luteinize Edici Hormonu
MCT	: Monokarboksilat taşıyıcılar
MKH	: Mezenkimal Kök Hücreler
NPS	: Neonatal Progeroid Sendrom
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
POMC	: Pro-opiomelanokortin
PKA	: Protein Kinaz A
PKCδ	: Protein Kinaz C Delta Tipi
RP3V	: Üçüncü ventrikülün rostral periventriküler bölgesi
SERCA2	: Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SEE	: Santral Erken Ergenlik
SOD2	: Süperoksit dismutaz 2
TLR4	: Toll benzeri reseptör 4

1. ÖZET

Vücut yağ ve kas ağırlığı belirli bir eşik değere ulaştığı zaman, çeşitli metabolik sinyaller puberte başlangıcını ve dolayısıyla üreme fonksiyonunu düzenleyen hipotalamik nöronal ağa bu bilgiyi iletir. Fakat bu metabolik tetikleyicilerin doğası hala net değildir. Literatürde vücut ağırlığı/metabolik durumla ilgili bilgilerin nöroendokrin üreme aksı ile ilişkilendirilmesinde; leptin, insülin ve ghrelin gibi çeşitli eksitatör ve inhibitör metabolik sinyallerin rolü belirlenmiştir. Fakat bu faktörler tek başlarına puberte ve üremenin metabolik düzenleyicileri değildirler. Buna bağlı olarak vücut yağ/kas kütlesi ile ilişkili olabilecek diğer potansiyel sinyallerin araştırılmasının gerekliliği söz konusudur. Beyaz yağ doku hücrelerinden salınan bir hormon olan asprosin, karaciğerden dolaşıma hızlı bir şekilde glikoz salınımına sebep olmaktadır. Yağ dokudan salgılanan asprosinin bir yandan karaciğerden kana glikoz salınmasını kontrol ettiğinin anlaşılması ve diğer yandan sperm motilitesini artırıcı etkisi bu hormonun erkeklerde enerji metabolizması ve üreme faaliyetlerinin başlaması arasında anahtar bir rol oynayabileceği düşüncesini doğurmaktadır. Ancak asprosinin nöroendokrin üreme aksı üzerindeki etki mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma kapsamında yapılacak olan in vitro çalışmalar ile asprosinin puberteye geçiş üzerindeki hipotalamik hücre hatlarına olası etkilerini inceleme amacıyla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), gonadotropin inhibitör hormon (GnIH) ve kisspeptin nöronları üzerinde etkileri belirlenmeye çalışıldı.

Çalışmada immortal hipotalamik hücre hatları GnRH (mHypoA GFP), GnIH (mHypoA50) ve kisspeptin (mHypoA GFP3) kullanıldı. Asprosinin farklı

dozlarda (1 nM,10 nM ve 100 nM) ve farklı zamanlarda (0., 30., 60., 90., 120. dakika) bu hücre hatlarındaki GnRH, GnIH ve Kisspeptin sekresyonu üzerindeki etkisi ELISA yöntemiyle belirlendi. Veriler Students't testi ve tek yönlü varyans analizi ve varyans analizinin ardından post-hoc Tukey's testi kullanılarak gerçekleştirildi.

Asprosinin 1nM ve 10 nM dozlarında uygulandığı GnRH hücre hattında; GnRH tüm zamanlarda anlamlı şekilde azalırken, 100 nM' da ise anlamlı şekilde artmıştır. GnIH hücre hattında, 1nM ve 10 nM asprosin dozlarında GnIH düzeyinde 30., 60., dakikalarda anlamlı bir artış, 100 nM dozda; yalnızca 120. dakikada anlamlı bir azalma görülmüştür. Kisspeptin hücre hattında 1 nM ve 10 nM asprosin uygulaması; kisspeptin düzeyinde tüm zamanlarda anlamlı bir azalışa yol açarken, 100 nM dozda ise anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu bulgular, asprosinin hipotalamik hücre hatları üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Bu durum puberteye geçiş ve üreme sisteminin merkezi olarak düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : Asprosin, GnRH, GnIH, kisspeptin, ELISA

2. ABSTRACT

The in vitro Investigation of Neuroendocrine Effects of the Asprosin Hormone in Hypothalamic Cell Lines.

When body fat and muscle weight reach a certain threshold, various metabolic signals transmit this information to the hypothalamic neuronal network that regulates the onset of puberty and thus reproductive function. However, the nature of these metabolic triggers is still unclear. In the literature, the role of various excitatory and inhibitory metabolic signals such as leptin, insulin and ghrelin in linking body weight/metabolic status information with the neuroendocrine reproductive axis has been established. However, these factors alone are not metabolic regulators of puberty and reproduction. Accordingly, there is a need to investigate other potential signals that may be related to body fat/muscle mass. Asprosin, a hormone released from white adipose tissue cells, causes a rapid release of glucose from the liver into the circulation. The understanding that asprosin secreted from adipose tissue controls the release of glucose from the liver into the bloodstream on the one hand, and its sperm motility-enhancing effect on the other, leads to the thought that this hormone may play a key role between energy metabolism and the onset of reproductive activities in men. However, the mechanism of action of asprosin on the neuroendocrine reproductive axis is still not fully elucidated. In this study, we aimed to determine the effects of asprosin on gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) and kisspeptin neurons in

order to examine the possible effects of asprosin on hypothalamic cell lines on the transition to puberty with in vitro studies.

Immortal hypothalamic cell lines GnRH (mHypoA GFP), GnIH (mHypoA50) and kisspeptin (mHypoA GFP3) were used in the study. The effects of asprosin at different doses (1 nM, 10 nM and 100 nM) and at different times (0, 30, 60, 90, 120 minutes) on GnRH, GnIH and Kisspeptin secretion in these cell lines were determined by ELISA method. Data were analyzed using Student's t test and one-way analysis of variance and analysis of variance followed by post-hoc Tukey's test.

In the GnRH cell line in which asprosin was administered at doses of 1 nM and 10 nM; GnRH was significantly decreased at all times and significantly increased at 100 nM. In the GnIH cell line, a significant increase in GnIH level was observed at 30., 60. minutes at 1nM and 10 nM asprosin doses, while at 100 nM dose; a significant decrease was observed only at 120 minutes. In the kisspeptin cell line, 1 nM and 10 nM asprosin treatment caused a significant decrease in kisspeptin levels at all times, while no significant difference was observed at 100 nM dose. These findings suggest that asprosin may have an effect on hypothalamic cell lines. This suggests that it may play an important role in the transition to puberty and central regulation of the reproductive system.

Key Words : Asprosin, GnRH, GnIH, kisspeptin, Elisa

3. GİRİŞ

3.1. Puberte Fizyolojisi

Puberte, bireylerin cinsel olgunluğa eriştikleri ve üreme yeteneği kazandığı fizyolojik bir süreçtir. Büyümenin bittiği ve üreme yeteneğinin başladığı insan gelişiminin tanımlayıcı bir aşamasıdır. Çocukluktan ergenliğe geçişteki olayların zamanlamasında doğal farklılıklar olmasına rağmen, temel süreçler tüm sağlıklı insanlarda ortaktır. Bu geçişin altında yatan temel mekanizma, hipofiz bezinden pulsatil bir şekilde salınan gonadotropin (Gn) seviyelerinin yükselmesiyle gonadal stimülasyondur (1). Süreç başladığında, hipotalamus artan genlik ve frekans ile pulsatil bir tarzda gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılamaya başlar. GnRH, hipofiz gonadotropinlerini, luteinize edici hormonu (LH) ve folikül uyarıcı hormonu (FSH) uyarır. Bu gonadotropinler, gonad düzeyinde hareket ederek östrojen ve progesteron veya testosteron salınımına neden olur (2).

MSS' nin işlevindeki ve hipotalamo-hipofiz (HH) eksenindeki değişiklikler, özellikle gonadotropinlerin (FSH ve LH) sekresyonunda artış meydana gelir, bu durum salınım sürecini destekler (3). Gn stimülasyonunu takiben gonadal seks steroidi üretimindeki artış, genital organlar, deri, meme, beyin, kas ve kemik dahil birçok dokudaki değişikliklerden sorumludur (1).

3.1.1. Puberteyi Etkileyen Faktörler

Genetik faktörler ergenlik yaşının en önemli belirleyicisi olarak kabul edilirken, beslenme, sosyoekonomik faktörler ve çevresel kirlenmeler de ergenlik başlangıcını etkiler (4). Kaprio ve arkadaşlarının ikiz kardeşlerde yaptığı bir araştırmada menarş yaşının % 74 oranında genetik faktörlerden, %26 oranında

çevresel faktörlerden etkilendiği sonucuna varılmıştır (5). Bununla beraber, pubertal büyümede genetik etkinin en fazla olduğu dönem, büyüme hızının peak yaptığı dönemdir (6).

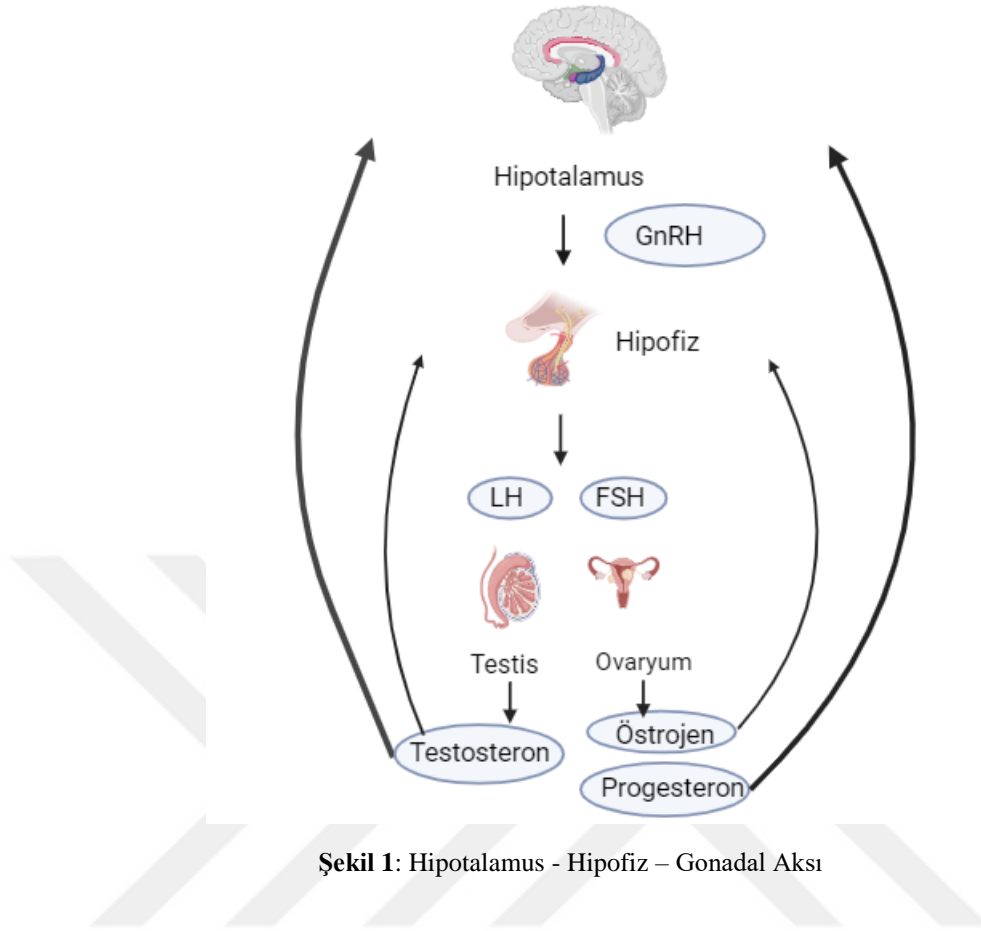
Stres, iskelet olgunluğu, metabolizma hızı, vücut yağ oranı gibi faktörlerin yanısıra; beslenme, sık enfeksiyonlar, sağlıklı bir çevreye göç, çevre kirliliği, böcek öldürücüler, antiandrojen ve östrojen benzeri kimyasallar ergenliğe etki eden diğer faktörlerdir (7).

Ergenlik öncesi büyümeyi etkileyen kronik hastalık gibi patolojik faktörler ergenliği geciktirebilir ve nihai yetişkin boyunu azaltabilir (1).

GnRH'nin pulsatil sekresyonu ve ardından gonadların aktivasyonu ile sonuçlanan HPG ekseninin erken olgunlaşması, GnRH bağımlı veya santral erken ergenliğe (SEE) neden olur. Klinik olarak SEE, kızlarda 8 yaşından önce meme gelişimi (telarş) veya erkeklerde 9 yaşından önce testis büyümesi ile karakterizedir (8).

3.1.2. Hipotalamus-Hipofiz-Gonadal Aks

Hipotalamik – hipofiz – gonadal (HHG) eksenini, doğurganlığın düzenlenmesinde işlev gören, birbiriyle iletişim halinde olan bir nöral ve endokrin sistemin hümorale bileşenidir. 1937'de Cambridge'de bir tıp öğrencisi olan Geoffrey Harris, hipofiz - gonadal ekseninin merkezi sinir sisteminin (MSS) kontrolü altında olduğuna dair kanıt sağlayan ilk kişiydi (9).



Şekil 1: Hipotalamus - Hipofiz – Gonadal Aksı

3.1.3. GnRH

Üreme ekseninin işlevinde anahtar rol oynayan GnRH; ilk olarak domuz hipotalamusundan izole edilmiş olup 10 amino asitli bir nöropeptittir. Hipotalamik nörosekresyon hücreleri (GnRH nöronları) tarafından üretilir ve pulsatil bir şekilde hipotalamo-hipofiz portal dolaşımına salınır, ardından ön hipofiz bezine ulaşır, burada LH ve FSH sentezini ve salınımını uyarır (10).

GnRH nöronlarının çoğunluğu medial bazal hipotalamusta, infundibulumda ve hipotalamusun periventriküler bölgesinde bulunur (11). GnRH ayrıca beynin dışındaki hücrelerde de bulunur, ancak rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. GnRH-I'in plasenta, bağışıklık sistemi, gonadlar ve endokrin

tümörler gibi hipofiz dışı dokularda otokrin ve/veya parakrin düzenleyici olarak görev yaptığı tahmin edilmektedir (12,13,14,15,16).

Omurgalıların çoğunda en az iki ve genellikle üç GnRH formu bulunur. İnsanlarda GnRH-I'e ek olarak GnRH-II adı verilen ikinci bir alt tip bulunmuştur. GnRH-II ilk olarak tavuk hipotalamusundan tanımlanmıştır (17,18). Orta beyin bölgesinde bulunan bir dekapeptit olan GnRH-II; bir hipofiz salma faktörü yerine bir nörotransmitter görevi görür. Yine de, GnRH-II; GnRH-I reseptörüne bağlanarak in vivo gonadotropin salınımını uyarabildiği gösterilmiştir.

GnRH-I ve GnRH-II, balıklardan memelilere kadar filogenetik olarak çeşitli türlerde bulunur, ancak GnRH-I'in ekspresyonu beyinde daha yüksekken, GnRH-II çoğunlukla diğer organlarda eksprese edilir (19,20).

Üçüncü bir GnRH formu olan GnRH-III, teleost balıklarında telensefalon nöronlarında tanımlanmıştır (21).

GnRH, farklı genlik ve frekanslarda salgılanır. GnRH sekresyonunun sıklığı, ön hipofizin gonadotropolarından LH'nin FSH sekresyonuna oranını değiştirir. Prolaktin, kortikotropin salgılatıcı hormon, glukokortikoidler, leptin, adiponektin, ghrelin, insülin, katekolaminler ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1 gibi hormonlar ve opiatlar gibi nörotransmitterler GnRH salınımını modüle eder (10).

GnRH aktivitesi çocukluk döneminde düşüktür ve ergenlik döneminde belirgin şekilde artar. GnRH'nın uygun pulsatil aktivitesi üreme için gereklidir ancak gebelik oluştuktan sonra artık gerekli değildir (22).

3.1.4. GnIH

2000 yılında hipofiz gonadotropin sekresyonunu inhibe eden yeni bir hipotalamik nöropeptit keşfedildi (23). Şimdi gonadotropin inhibe edici hormon olarak adlandırılan bir dekapeptit olan GnIH; başlangıçta kuşlarda, daha sonra memelilerde ve diğer omurgalılarda tanımlandı (24). GnIH nöronları, hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde bulunur (25). GnIH, kuşların ve memelilerin hipofiz ve GnRH nöronları üzerinde bir GPCR (GPR 147) aracılığıyla etki ederek LH β - ve FSH β - alt birimlerinin salınımını ve sentezini inhibe eder (24). Ayrıca gonadlarda GnIH ve GnIH reseptörünün varlığı ve bunların steroid biyosentezi ve gamet olgunlaşması ile ilgili hücrelerde ekspresyonu; GnIH'nin steroidogenez ve gametogenez üzerindeki düzenleyici rolünü ortaya koymaktadır (26). Hamsterlerde GnIH, seminifer tübüllerde bulundu ancak GnIH reseptörü ekspresyonu yalnızca spermatozoidler ve spermatidlerle sınırlıydı (27). GnIH'nin memelilerdeki fizyolojik rolü hala büyük ölçüde çözülmemiştir. GnIH, juvenil ve prepubertal farelerde LH sekresyonunu baskılar, ancak pubertenin zamanlaması, ilerlemesi veya süresinde önemli bir rolü olması olası değildir (28). GnIH'nin, GnRH nöronlarının kisspeptin kaynaklı aktivasyonunu kesebileceği bulunmuştur (29). GnIH'nin stres kaynaklı üreme bozulmasının bir aracısı olarak da hareket edebileceği düşünülmektedir (24).

3.1.5. Kisspeptin

Kisspeptin, HHG ekseninin işlevinde kritik bir rolü olan bir nöropeptiddir ve hipotalamusta; üçüncü ventrikülün (RP3V) rostral periventriküler bölgesinde ve arkuat çekirdekte (ARC) bulunan iki ana nöron popülasyonu tarafından üretilir. Bu nöronlar hipotalamusta GnRH nöronlarına (kisspeptin reseptörü, Kiss1r

aracılığıyla hareket eden) projekte olur, bunları aktive eder ve GnRH salgılanmasını uyarır (30). İnsanlarda, kisspeptinin plasenta içindeki hücre popülasyonlarında ve yumurtalıklarda, testislerde, ince bağırsakta ve pankreasta eksprese edildiği bulunmuştur (31). Kisspeptinin ilk keşfinden birkaç yıl sonra, başlangıçta GPR54 olarak bilinen, peptite güçlü afinite ile bağlanan bir G-protein-bağlı reseptör keşfedildi (32). Kisspeptinin üreme eksenindeki öneminin keşfedilmesiyle, Kisspeptin reseptörü GPR54; Kiss1r olarak bilinir hale gelmiştir (33). Neredeyse aynı anda yayınlanan iki çalışma, kisspeptin/Kiss1r sinyalinin GnRH ve gonadotropinlerin salgılanması için ana uyarıcı olduğunu göstermiştir (34).

3.2. Asprosin Hormonu

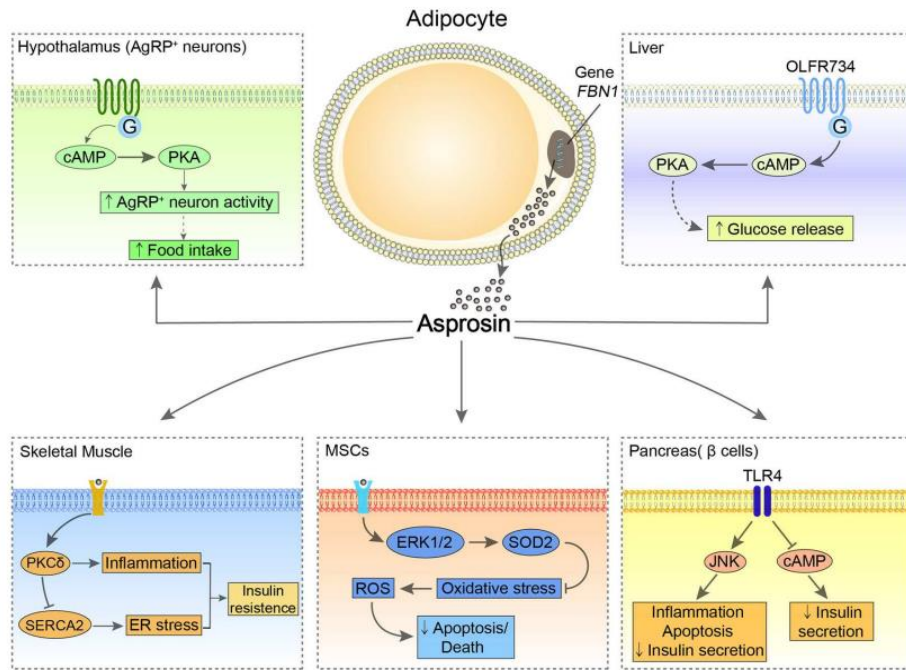
Fibrillin 1 (FBN1) geninin iki ekzonu (ekzon 65 ve ekzon 66) tarafından kodlanan asprosin, yeni bir glukojenik adipokindir ve esas olarak açlık sırasında beyaz adipoz doku tarafından sentezlenir ve salınır (35).

Romere ve ark. 2016 yılında Neonatal Progeroid Sendrom (NPS) üzerine yaptıkları genetik çalışma esnasında bu hormonu keşfetmişlerdir. İki NPS hastasında glikoz ve insülin homeostazisini incelediklerinde bu hastalarda öglisemi sürdürülürken, insülinin azaldığı gözlemlenmiştir. NPS'li hastalarda gece boyu aç kalmanın ardından ölçülen plazma insülin değerleri normal kişilere göre 2 kat düşük bulunmuştur. Genetik teşhis için bu 2 hasta ile daha önce NPS tanısı alan literatürdeki benzer 5 vakanın karşılaştırılması yapılmış; 7 hastanın hepsinde fibrillin 1 proteinini kodlayan genin (FBN1) 3' kısmına yakın bölümünde mutasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Tüm mutasyonlarda

profibrillinin C terminal klivaj ürününün olmadığını gözlemlemişlerdir. Kaynağının beyaz adipoz doku olduğu ortaya çıkınca Grekçe beyaz (aspros) kelimesine benzeyen asprosin adını vermişlerdir. Asprosin profibrillin'in C terminal bölünme ürünüdür ve FBN1'in son iki eksonu tarafından kodlanır. Toplamda 140 amino asitten oluşan asprosinin 11 amino asidini ekson 65, 129 amino asidini ise ekson 66 kodlar. Tüm insan dokularının FBN1 mRNA profili incelendiğinde mRNA ekspresyonunun en fazla adipoz dokuda olduğu bulunmuştur (36).

235 kb uzunluğunda olan FBN1, 15q21.1 kromozomunda yer almaktadır (37). Bu ekzonlar, 2871 amino asit uzunluğunda olan bir proproteini kodlar. Çevrilen bu pro-protein, olgun fibrillin-1 ve 140 amino asit uzunluğunda asprosin üreten aktive edilmiş proteaz furin tarafından C ucunda parçalanır(38,39). Beyaz dipoz dokusu asprosin için önemli bir kaynaktır, ancak FBN1 mRNA'nın kalp, akciğer vb. birçok organda yüksek oranda eksprese edildiği dikkate alındığında, asprosinin yalnızca beyaz adipositlerden türetilip üretilmediği kesin değildir (36). Ayrıca β -hücreleri hiperlipidemik koşullarda da asprosin salgılayabilirler (40). Asprosin sentezlendikten sonra kana salınıp açlık koşullarında artan bir plazma konsantrasyonu gösterir. Asprosin, periferik hedef dokular üzerinde etkisinin yanı sıra kan-beyin bariyerini de geçebilir ve MSS üzerinde bir etkiye sahip olabilir (36,41). MSS, periferik dokular ve organlar üzerinde birçok etkisinin olduğu bildirilen asprosinin; çoklu aşağı akış sinyal yolları aracılığıyla iştahı, glikoz metabolizmasını, ID'ni (İnsülin Direnci), hücre apoptozunu vb. düzenlemede önemli bir etkiye sahiptir (35).

Asprosinin merkezi reseptörleri, esasen hipotalamik arkuat çekirdekte bulunur ve iştahın artmasına katkıda bulunur. Beslenme kontrol merkezi olarak hipotalamus; iki tip nöron popülasyonuna dayanarak iştahı düzenler: anoreksijenik pro-opiomelanokortin (POMC) nöronları ve oreksijenik agouti ile ilişkili peptit (AgRP) nöronları (42). Asprosin, AgRP nöronlarının amplitüdünü artırır ve membran potansiyellerini değiştirir, bu da AgRP nöronlarının aktivitesini bir G proteinleri-cAMP-PKA eksenini artırır. Aynı zamanda, bu sinyalleşme POMC nöronlarının aktivitesini GABA'ya bağımlı bir şekilde inhibe eder, böylece gıda alımını uyarır ve enerji homeostazını düzenler (41).



Şekil 2: Asprosin hormonunun merkezi ve periferik sistem üzerindeki etki mekanizması (35).

Asprosinin periferdeki ana hedef organ ve dokuları; karaciğer, pankreas, iskelet kası ve kalp olmakla beraber; karaciğer üzerindeki biyolojik etkisinin, adenilil siklaz-PKA-cAMP yanıtı element bağlama (CREB) yolunu aktive eden ve glikoz üretimine/salınmasına yol açan G protein-bağlı reseptöre (GPCR) bağlı olduğu bildirilmiştir (36).

Yapılan son çalışmalar koku alma reseptörü olan 734'ün (OLFR734); asprosinin bu etkiye aracılık eden reseptörlerinden biri olduğu sonucunu ortaya koysa da, asprosinin glukojenik fonksiyonundan sorumlu tek reseptör OLR734 değildir (43).

Asprosinin hepatik glikoz üretimine ve gıda alımına aracılık etmede diğer glukojenik ve iştahla ilgili hormonlarla nasıl etkileşime girdiği tam olarak açıklanamamıştır. Glukagon, epinefrin, norepinefrin ve glukokortikoidler dahil olmak üzere hormonların hepatositlerden glikoz salınımını arttırdığı bilinmektedir. İlginç bir şekilde, Romere ve ark. asprosin tedavisinin yukarıdaki glukojenik hormon seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmadığını kaydetmiştir. Ayrıca, glukagonun glukojenik etkilerinin, G protein-cAMP PKA ekseninin etkinleştirilmesi yoluyla da elde edilebileceği yaygın olarak bilinmektedir; Bununla birlikte, glukagon reseptörünü inhibe eden, asprosinin hepatositler üzerindeki glukojenik etkileri üzerinde hiçbir etkisi yoktur (36). Bu, asprosinin glikoz salınımını desteklemede nispeten bağımsız bir rol oynadığını gösterir. İştah aracılık etkilerine gelince, aynı ekip tarafından yapılan bir araştırma, mideden salınan iyi bilinen bir oreksijenik hormon olan asprosin ve ghrelin arasındaki bağlantıyı gösterdi.

Bulgular, AgRP nöronlarının fraksiyonel örtüşen bir alt kümesinin hem asprosin hem de ghrelin tarafından aktive edilebileceğini ortaya koydu. Ayrıca, asprosin eksikliği, ghrelin'in AgRP nöronlarını aktive etme yeteneğinin azalmasına neden oldu. Ghrelin reseptörü ise asprosinin AgRP nöronlarını aktive edebilmesi için vazgeçilmezdir (41).

Hipotalamusta asprosin, G proteinleri-cAMP-PKA yolunu aktive ederek AgRP nöronlarının aktivitesini artırarak iştahın artmasına neden olur. Karaciğerde asprosin, CREB yolu yoluyla glikoz üretimini ve salımını artırmak için OLF734'e bağlanır. Ek olarak, asprosinin oreksijenik ve glukojenik rolleri tartışmalıdır. Pankreatik β -hücrelerinde asprosin, TLR4'e bağlanarak bu hücrelerin iltihaplanmasını ve apoptozu teşvik eder, TLR4/JNK aracılı yolağı uyarır, cAMP seviyelerini inhibe eder böylelikle insülin sekresyonunu azaltır.

MKH'lerde asprosin, ERK1/2-SOD2 yolunu aktive eder böylelikle bu hücrelerin oksidatif strese bağlı apoptozu ve ölümü önlenmiş olur. İskelet kasında asprosin, IR'yi desteklemek için PKC δ /SERCA2 aracılı ER stres/iltihap yollarını aktive eder (35).

3.3. Asprosin ve Üreme İlişkisi

Memelilerde normal gonadal aktiviteler, HHG ekseninin çeşitli endokrin faktörleri ve periferik organlardaki besin veya enerjinin mevcudiyetiyle yönetilen, yüksek miktarda enerji gerektiren bir süreçtir (44). Yağ dokusu, enerji kaynaklarının önemli bir rezervidir ve açlık sırasında enerji homeostazını ve dağılımını düzenleyen aktif bir endokrin organdır (45). Ayrıca ergenliğin başlangıcında, doğurganlıkta, cinsel davranışın mevsimsel düzenlenmesinde ve enerji mevcudiyetine uyum sağlamada kritik bir rol oynar (46,47). Glikoz, gonadal aktiviteler için enerji sağladığından, beslenme ve üreme arasında önemli bir bağlantı olarak kabul edilir (44). Erkeğin sağlıklı üreme fonksiyonları büyük ölçüde testiküler glikoz alımına ve bunun testis hücreleri tarafından metabolizmasına bağlıdır (48). Testiste glikoz, glikoz taşıyıcıları (GLUT'lar)

tarafından kan testis bariyerini geçerek Sertoli hücrelerine taşınır (49,50). İnsülin, GLUT8 taşıyıcısının ekspresyonunu artırarak ve LDH enzimini aktive ederek glikoz taşınmasını düzenler (51,52,53). Sertoli hücrelerinde glikoz önce glikoliz ile piruvata dönüştürülür ve ardından piruvat laktat dehidrojenaz-A enzimi tarafından laktata dönüştürülür (54). Monokarboksilat taşıyıcılar (MCT 2 ve 4), laktatın üreme hücrelerine beslenme desteği sağladıkları üreme hücrelerine taşınmasında rol oynar. Laktat sentezi, testis germ hücreleri üzerinde anti-apoptotik bir etkiye sahiptir (52). Yağ dokusu, adipokinler adı verilen biyoaktif hormonların sentezi ve salınması yoluyla hem metabolik hem de üreme işlevlerinde yer alır (55,56). Literatürdeki yer alan çalışmalar, asprosin dahil adipokinlerin farklı dokular üzerinde endokrin etkilere sahip olduğunu ve fizyolojik fonksiyonlarını etkilediğini göstermektedir (57). HHG eksenini, çeşitli adipokinler tarafından modüle edilir (56,58). Leptin, ön hipofizden LH ve FSH salınımını daha da tetikleyen hipotalamustan GnRH sentezini uyararak üreme fonksiyonlarını düzenler (59). Adiponektin, hipofiz hücrelerini FSH ve insülin kaynaklı LH üretmeye teşvik ederek HHG eksenini üzerinde bir etkiye sahiptir (60). LH salgılanması benzer şekilde leptin tarafından indüklenir (61). Adiponektin uygulaması, yaşlı farelerde testiküler steroidogenezi ve spermatogenezi iyileştirir (55). Benzer şekilde visfatin de doğrudan Leydig hücreleri üzerinde etki ederek testiküler steroidogenezi indükler (56). Bu bulgular, gonadal fonksiyonların ve doğurganlığın düzenlenmesi için adipokinler ve HHG eksenini arasında kompleks bir sistem olduğunu düşündürmektedir (62).

Asprosin, memelilerde adipoz doku-karaciğer-pankreas eksenini yoluyla glikoz homeostazının düzenlenmesinde yer alan glukojenik bir adipokindir (36).

Asprosin nanomolar düzeyde dolaşır ve biyolojik etkisini OLF734 aracılı cAMP-PKA hücre içi yolu aracılığıyla gösterir. Ayrıca organlar arası karışma yoluyla açlık koşullarında iştahı uyaran oreksijenik bir peptid olarak kabul edilir (41). Asprosin, açlık koşullarında hepatik glukoz üretimini indüklerken, olgun adipositler tarafından dolaşımdaki salgılanması beslenme sırasında durdurulur. Dolaşımdaki glikoz, asprosinin negatif geri besleme düzenleyicisi olarak işlev görür. Yapılan çalışmalarda rekombinant asprosinin eksojen uygulamasının hayvanlarda dolaşımdaki glikoz ve insülin seviyelerini artırırken insülin duyarlılığını ve glikoz homeostazını koruduğunu ileri sürmektedir (36). Son zamanlarda, fare testislerinde asprosin ve OLF734 reseptör ekspresyonunda yaşa bağlı varyasyonlar olduğu, asprosin tedavisinin testiküler glikoz alımını, testosteron ve laktat sentezini artırdığını ve yaşlı farelerin testislerinde doğurganlığı iyileştirdiği görülmüştür (62,63). Tüm bu bulgular, doğurganlığı desteklemek için asprosin ve testiküler süreçler arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu bulgulara dayanarak, asprosinin fare testisinde testiküler metabolizma, steroidogenez ve spermatogenezin düzenlenmesinde yer alan bir otokrin/parakrin faktör olarak hareket edebileceği varsayılmaktadır (62).

3.4. Çalışmanın Amacı

Adipokinlerin memelilerde üreme fizyolojisinde yer aldığı bilinmekle beraber üreme fonksiyonlarında asprosinin rolü üzerine yapılan çok az çalışma vardır. Bu çalışma, asprosinin GnRH, GnIH ve kisspeptin (Kiss1) salgılanması üzerindeki rolünü hücre kültürü teknikleri kullanarak in vitro olarak araştırmayı amaçlamaktadır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'nun 2020/10 sayılı kararıyla etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik – Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmanın bütçesi, 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı ile 220S744 numaralı TÜBİTAK projesi kararı gereğince karşılanmıştır.

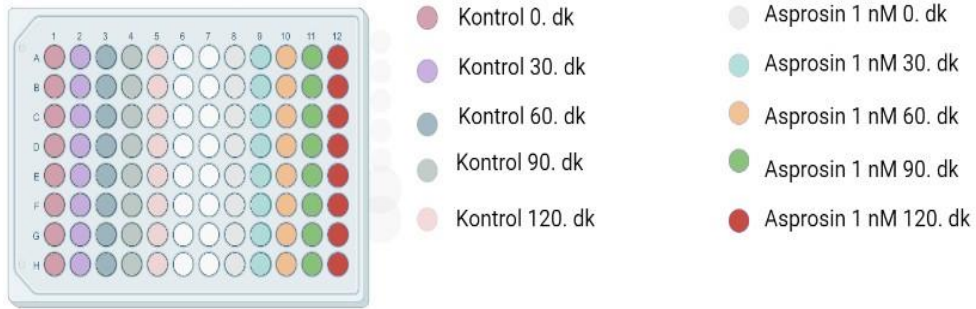
Bu çalışmada; GnRH, GnIH ve kisspeptin salgılayan immortal hipotalamus hücre hatları, sırasıyla mHypoA GFP, mHypoA50 ve mHypoA GFP3 ticari isimleriyle satın alınıp, ilgili hücre hatlarında asprosin hormonun GnRH, GnIH ve kisspeptin salınımına etkisi ELISA yöntemiyle ölçülmüştür.

4.1. Hücre Kültürünün Hazırlanması

- İmmortal GnRH, GnIH ve kisspeptin hücreleri ; %10 fetal buzağı serumu (FBS), 550 mg/L L-glutamin, 100 U/L penisilin, 100 µg/ml streptomisin ihtiva eden kültür medyumunda 37 °C ve %95 O₂ %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi.
- Hücreler, %0.125 tripsin(Sigma) ile 37 °C'de 8 dakika muamele edilerek ayrıştırıldı ve daha sonra 1600 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi.
- Dibe çöken pelletin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı, sonrasında kültür medyumu eklendi.

4.2. Asprosin Uygulamasının GnRH Sekresyonuna Etkisinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

- Yeterli sayıya ulaşan hücre kültür ortamındaki GnRH salgılayan hücreler Thoma lamıyla sayıldı.
- Her kuyucuğa 100 µl (5×10^4) hücre eklenecek şekilde GnRH salgılayan hücreler plate'lere ekildi.
- Plate'lerdeki hücreler 37 °C ve %95 O₂ %5 CO₂ içeren nemli ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutuldu.
- İnkübasyon süresi dolduktan sonra her bir kuyucuktaki pelletin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı.
- Şekilde gösterildiği gibi GnRH salgılayan hücrelere; 1nM, 10 nM ve 100 nM dozunda asprosin uygulaması yapıldı.

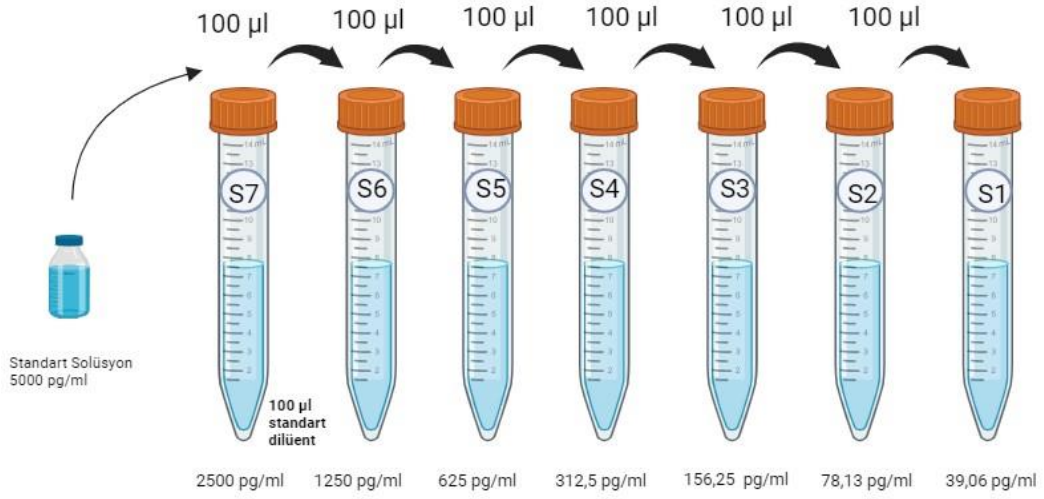


Şekil 3: GnRH salgılayan hücre hatlarına asprosin 1 nM doz uygulaması



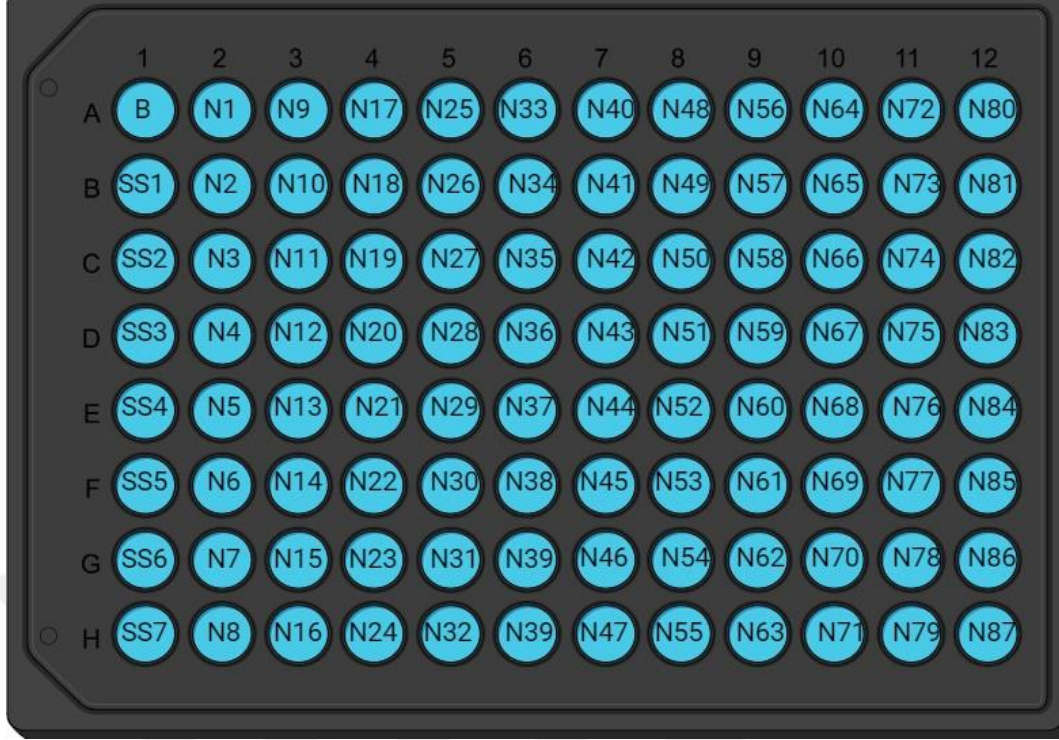
Şekil 4: GnRH salgılayan hücre hatlarına aspirin 10 nM ve 100 nM doz uygulaması

- Kuyucuklardaki hücreler 0., 30., 60., 90., 120. dakikalarda pipet yardımıyla çekilip ELISA ölçümü yapılmak üzere $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta muhafaza edildi
- Deney gününde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta bekletilen hücreler ortam sıcaklığına alındı.
- GnRH ölçümü yapılırken ELISA kitinde yazan deney protokolü esas alındı. Deneye başlamadan önce kitin içinde bulunan standart solüsyonu, örnek dilüsyon solüsyonu ile sulandırılarak 5000 pg/ml konsantrasyona sahip olan stok (standart) solüsyon elde edildi. Elde edilen bu standart, dilüsyon için kullandığımız solüsyon kullanılarak;
- Standart Solüsyon (S1) 39,06 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S2) 78,13 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S3) 156,25 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S4) 312,5 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S5) 625 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S6) 1250 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S7) 2500 pg/ml konsantrasyonları elde edilecek şekilde seyreltilti.



Şekil 5: GnRH ölçümünde standart solüsyonunun ELISA protokolüne uygun bir şekilde dilüe edilmesi.

Dilüsyon işleminin sonunda elde edilen standartlar, GnRH salgılayan hücre hattı numuneleri, ELISA tamponu ve antikorlar 96 kuyucuklu ELISA kit plağına Şekil 6’da gösterildiği gibi pipet yardımıyla eklendi.



Şekil 6: GnRH sekresyon ölçümünde kit plağının düzeni (B : Blank kuyucuğu, SS: standart solüsyon eklenen kuyucuk ve N: GnRH salgılayan hücre numunesi eklenen kuyucuk).

Kit plağı düzenlendikten sonra ELISA protokolü aşağıdaki sırayla uygulandı:

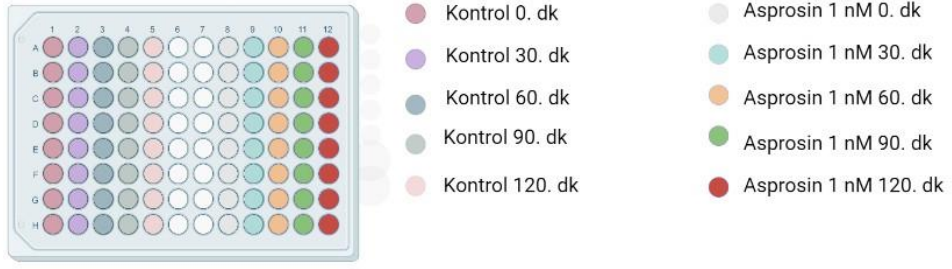
- Standartlar solüsyonlar, numuneler ve biotin her birinden 50 μ L olacak şekilde Şekil 6'da belirtilen kuyucuklara eklendi ve plate'in üzeri plate kaplama membranı ile kapatılıp 45 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırılıp 3 defa yıkama yapıldı.
- Sonrasında, her kuyucuğa 100 μ L HRP eklendi ve plate'in üzeri yeni bir plate kaplama membranı ile kapatılıp 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra, her bir kuyucuktaki sıvı uzaklaştırıldı ve toplam 5 kez yıkama solüsyonu (her bir kuyucuk için 300 µL) ile yıkama yapıldı. 5. yıkamanın sonunda plate kağıt havluya ters çevirip vurularak kurutuldu.
- Ardından tüm kuyucuklara 90 µL Substrat solüsyonu eklendi ve ışıktan koruyarak 15-30 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi ve hafifce karıştırıldı.
- Deneyin son aşamasında; plate, ELISA plate okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu

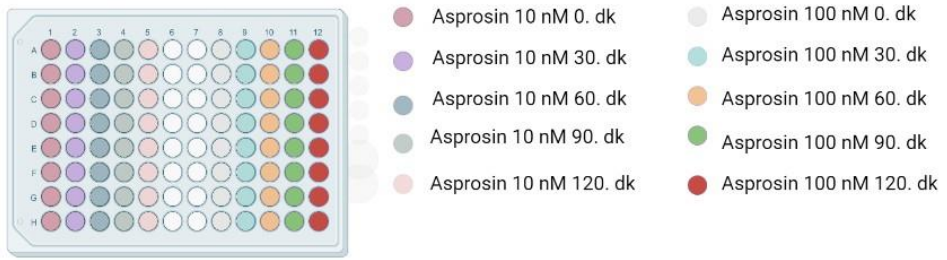
4.3. GnIH Sekresyon Ölçümü

4.3.1. Asprosin Uygulamasının GnIH Sekresyonuna Etkisinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

- Yeterli sayıya ulaşan hücre kültür ortamındaki GnIH salgılayan hücreler Thoma lamıyla sayıldı.
- Her kuyucuğa 100 µl (5×10^4) hücre eklenecek şekilde GnIH salgılayan hücreler plate'lere ekildi.
- Plate'lerdeki hücreler 37 °C ve %95 O₂ %5 CO₂ içeren nemli ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutuldu.
- İnkübasyon süresi dolduktan sonra her bir kuyucuktaki pelletin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı.
- Şekilde gösterildiği gibi GnIH salgılayan hücrelere 1nM, 10 nM ve 100 nM dozunda asprosin uygulaması yapıldı.

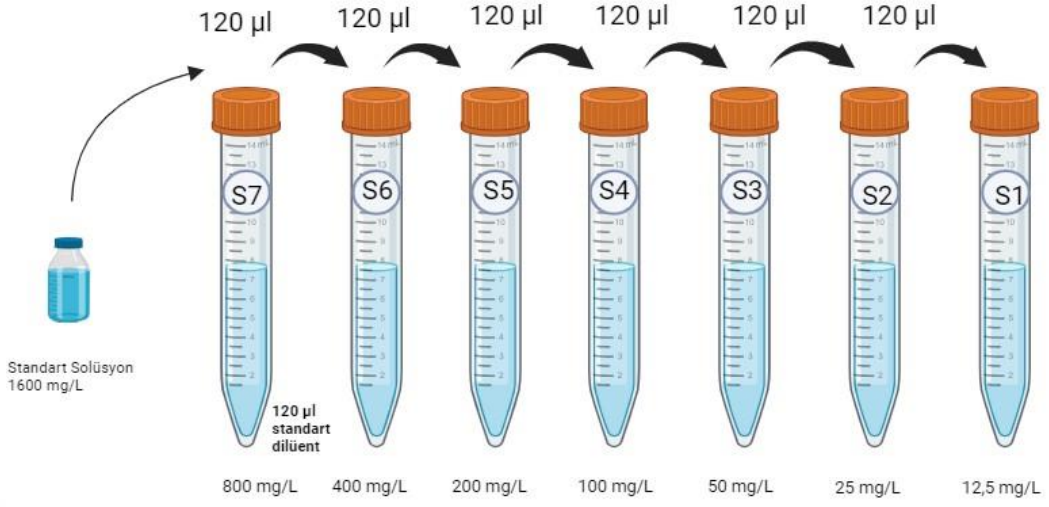


Şekil 7: GnIH salgılayan hücre hatlarına asprosin 1 nM doz uygulaması.



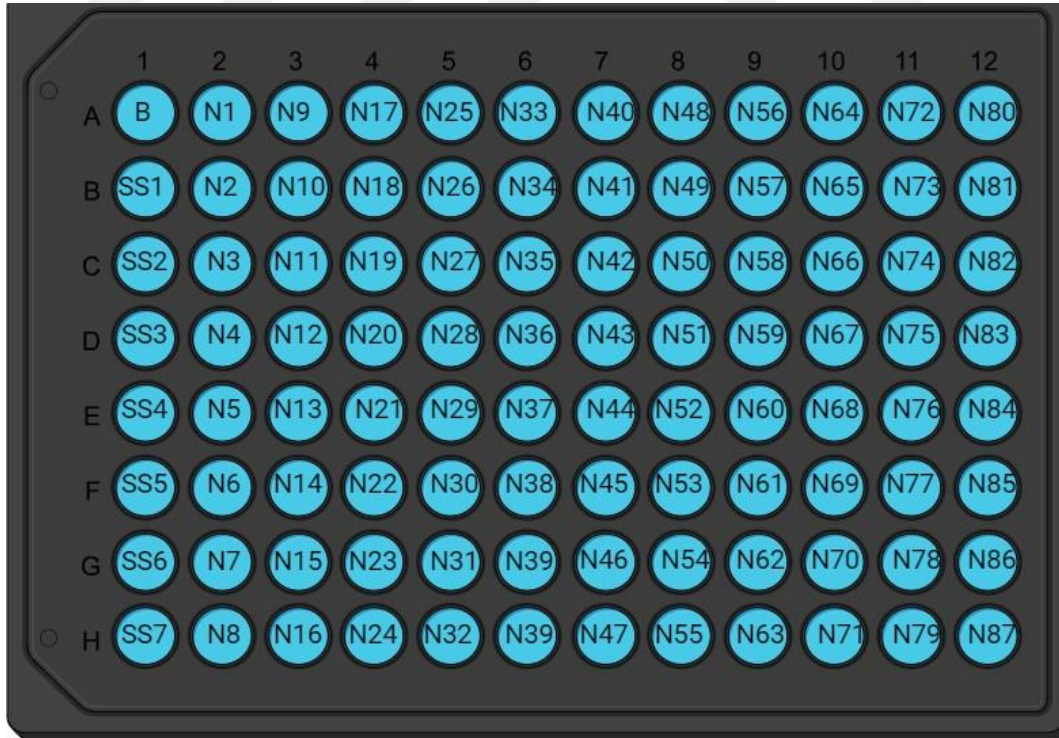
Şekil 8: GnIH salgılayan hücre hatlarına asprosin 10 nM ve 100 nM doz uygulaması

- Kuyucuklardaki hücreler 0., 30., 60., 90., 120. dakikalarda pipet yardımıyla çekilip ELISA ölçümü yapılmak üzere -20 ° sıcaklıkta muhafaza edildi
- Deney gününde -20 ° sıcaklıkta bekletilen hücreler ortam sıcaklığına alındı.
- GnIH ölçümü yapılırken ELISA kitinde yazan deney protokolü esas alındı. Deneye başlamadan önce kitin içinde bulunan standart solüsyonu, örnek dilüsyon solüsyonu ile sulandırılarak 1600 mg/mL konsantrasyona sahip olan stok (standart) solüsyon elde edildi. Elde edilen bu standart, dilüsyon için kullandığımız solüsyon kullanılarak;
 - 1. Standart Solüsyon (S1) 12,5 mg/mL,
 - 2. Standart Solüsyon (S2) 25 mg/mL,
 - 3. Standart Solüsyon (S3) 50 mg/mL,
 - 4. Standart Solüsyon (S4) 100 mg/ml,
 - 5. Standart Solüsyon (S4) 200 mg/mL,
 - 6. Standart Solüsyon (S5) 400 mg/mL,
 - 7. Standart Solüsyon (S6) 800 mg/mL konsantrasyonları elde edilecek şekilde seyreltildi.



Şekil 9: GnIH sekresyon ölçümünde standart solüsyonunun ELISA protokolüne uygun bir şekilde dilüe edilmesi.

Dilüsyon işleminin sonunda elde edilen standartlar, GnIH salgılayan hücre numuneleri, ELISA tamponu ve antikorlar 96 kuyucuklu ELISA kit plağına Şekil 10'da gösterildiği gibi pipet yardımıyla eklendi.



Şekil 10: GnIH sekresyon ölçümünde kit plağının düzeni (B: Blank kuyucuğu, SS: standart solüsyon eklenen kuyucuk ve N: GnIH salgılayan hücre numunesi eklenen kuyucuk).

Kit plağı dzenlendikten sonra ELISA protokolü aşağıdaki sırayla uygulandı:

- Standartlar solüsyonlar 50 µL, numuneler ise 40 µL olacak şekilde şekil 10'da belirtilen kuyucuklara eklendi.
- Ardından 10 µL Biotin, 50 µL HRP solüsyonu eklenerek plate'in üzeri plate kaplama membranı ile kapatılıp 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırılarak her kuyucu için 300 µL olacak şekilde 5 defa yıkama yapıldı. 5. yıkamanın sonunda plate kağıt havluya ters çevirip vurularak kurutuldu.
- Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A sonrasında ise 50 µL kromojen B eklenerek plate'in üzeri yeni bir plate kaplama membranı ile kapatılıp 10 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi ve hafifce karıştırıldı.
- Deneyin son aşamasında; plate, ELISA plate okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu.

4.4. Kisspeptin Sekresyon Ölçümü

4.4.1. Asprosin Uygulamasının Kisspeptin Sekresyonuna Etkisinin ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

- Yeterli sayıya ulaşan hücre kültür ortamındaki kisspeptin salgılayan hücreler Thoma lamıyla sayıldı.
- Her kuyucuğa 100 µl (5×10^4) hücre eklenecek şekilde kisspeptin salgılayan hücreler plate'lere ekildi.
- Plate'lerdeki hücreler 37 °C ve %95 O₂ %5 CO₂ içeren nemli ortamda 24 saat inkübasyona tabi tutuldu.
- İnkübasyon süresi dolduktan sonra her bir kuyucuktaki pelletin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı.
- Şekilde gösterildiği gibi kisspeptin salgılayan hücelere 1nM, 10 nM ve 100 nM dozunda asprosin uygulaması yapıldı.



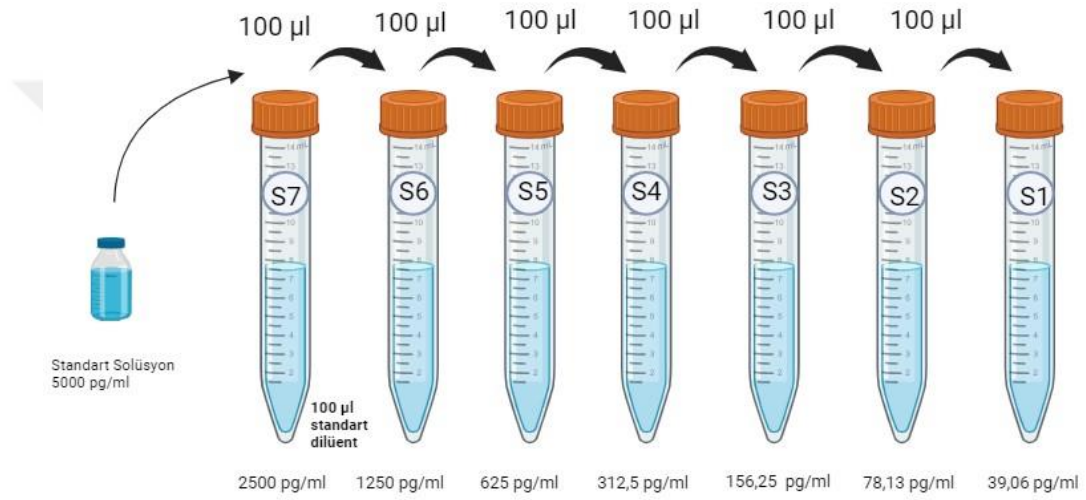
Şekil 11: Kisspeptin salgılayan hücre hatlarına asprosin 1 nM doz uygulaması.



Şekil 12: Kisspeptin salgılayan hücre hatlarına asprosin 10 nM ve 100 nM doz uygulaması.

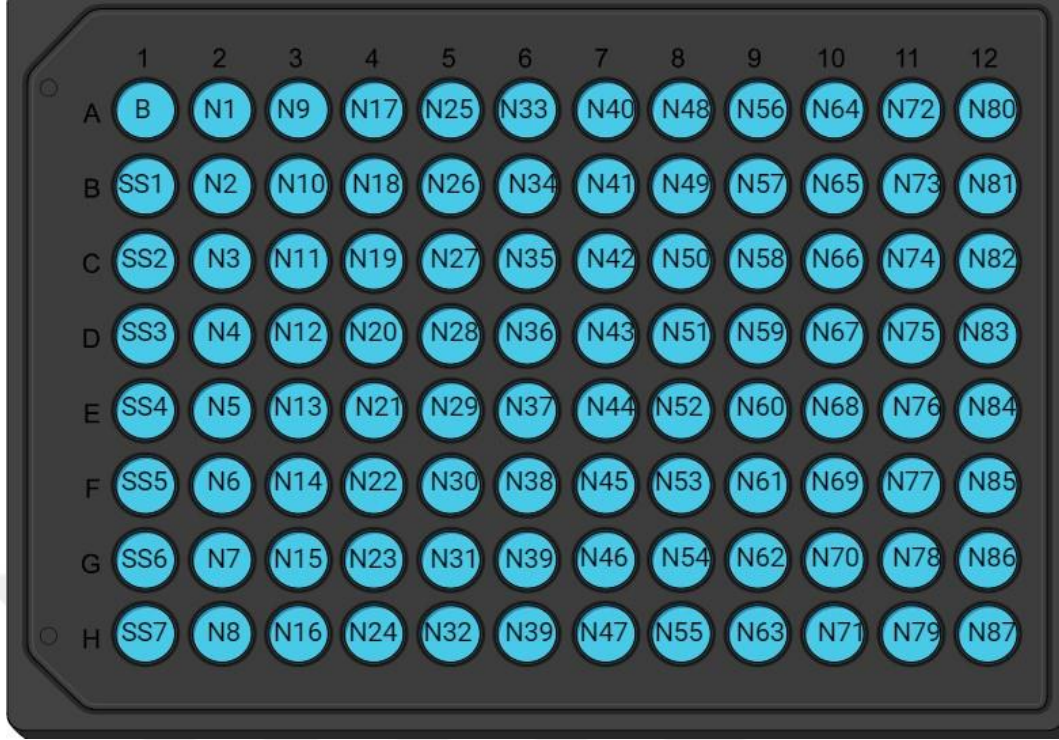
- Kuyucuklardaki hücreler 0., 30., 60., 90., 120. dakikalarda pipet yardımıyla çekilip ELISA ölçümü yapılmak üzere -20 °C sıcaklıkta muhafaza edildi
- Deney gününde -20 °C sıcaklıkta bekletilen hücreler ortam sıcaklığına alındı.
- Kisspeptin ölçümü yapılırken ELISA kitinde yazan deney protokolü esas alındı. Deneye başlamadan önce kitin içinde bulunan standart solüsyonu, örnek dilüsyon solüsyonu ile sulandırılarak 5000 pg/mL konsantrasyona sahip olan stok (standart) solüsyon elde edildi. Elde edilen bu standart, dilüsyon için kullandığımız solüsyon kullanılarak;
- Standart Solüsyon (S1) 39,06 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S2) 78,13 pg/ml,

- Standart Solüsyon (S3) 156,25 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S4) 312,5 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S5) 625 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S6) 1250 pg/ml,
- Standart Solüsyon (S7) 2500 pg/ml konsantrasyonları elde edilecek şekilde seyreltildi.



Şekil 13: Kisspeptin ölçümünde standart solüsyonunun ELISA protokolüne uygun bir şekilde dilüe edilmesi.

Dilüsyon işleminin sonunda elde edilen standartlar, Kisspeptin hücre hattı numuneleri, ELISA tamponu ve antikorlar 96 kuyucuklu ELISA kit plağına Şekil 14'te gösterildiği gibi pipet yardımıyla eklendi.



Şekil 14: Kisspeptin sekresyon ölçümünde kit plağının düzeni (B: Blank kuyucuğu, SS: standart solüsyon eklenen kuyucuk ve N: Kisspeptin salgılayan hücre numunesi eklenen kuyucuk).

Kit plağı düzenlendikten sonra ELISA protokolü aşağıdaki sırayla uygulandı:

- Standartlar solüsyonlar, numuneler ve biotin her birinden 50 μ L olacak şekilde Şekil 14'te belirtilen kuyucuklara eklendi ve plate'in üzeri plate kaplama membranı ile kapatılıp 45 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırılıp 3 defa yıkama yapıldı.
- Sonrasında, her kuyucuğa 100 μ L HRP eklendi ve plate'in üzeri yeni bir plate kaplama membranı ile kapatılıp 30 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi.

- İnkübasyondan sonra, her bir kuyucuktaki sıvı uzaklaştırıldı ve toplam 5 kez yıkama solüsyonu (her bir kuyucuk için 300 μ L) ile yıkama yapıldı. 5. yıkamanın sonunda plate kağıt havluya ters çevirip vurularak kurutuldu.
- Ardından tüm kuyucuklara 90 μ L Substrat solüsyonu eklendi ve ışıktan koruyarak 15-30 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 50 μ L stop solüsyonu eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
- Deneyin son aşamasında; plate, ELISA plate okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okundu.

4.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel karşılaştırmaları Students't testi ve tek yönlü varyans analizi ve varyans analizinin ardından post-hoc Tukey's testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde p değerinin 0.05'den az olduğu durumlar istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

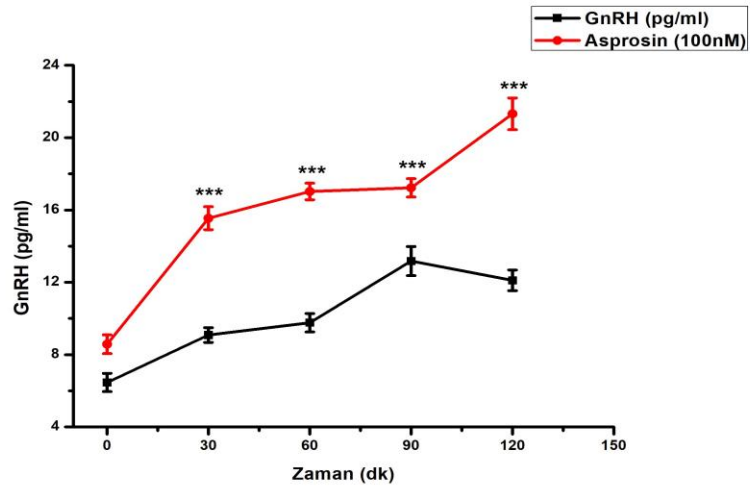
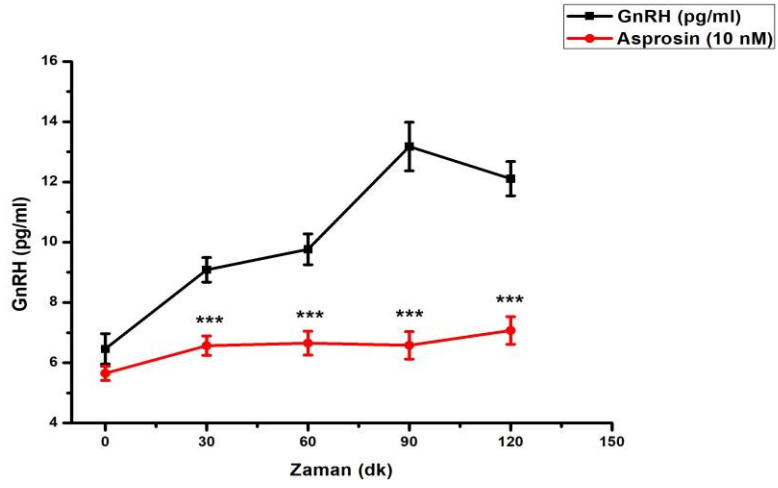
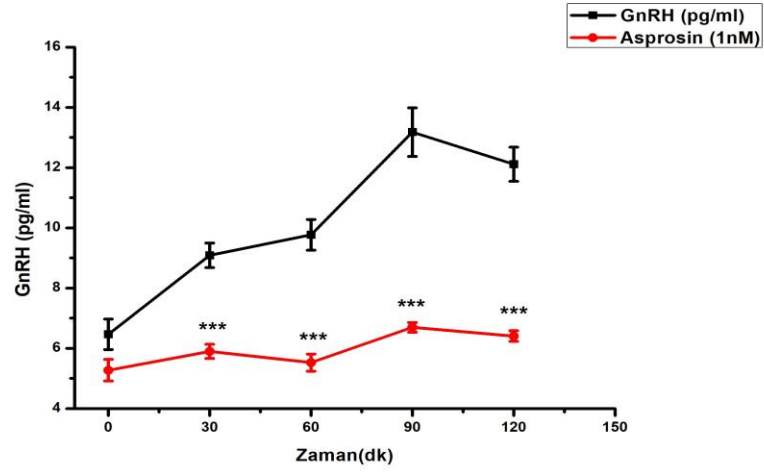
5. BULGULAR

5.1. GnRH Salgılayan Hücre Hatlarında Asprosinin Doz ve Zamana Göre Değişimi

Asprosin hormonunun farklı dozları mHypoA hücre hatlarındaki GnRH sekresyonunu doz ve zamana göre farklı şekilde etkilemiştir.

Asprosin 1 nM ve 10 nM dozda uygulandığında; 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda anlamlı bir şekilde azalırken,

Asprosin 100 nM dozda uygulandığında ise 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda anlamlı bir şekilde artmıştır.



Şekil 15: mHypoA GFP hücre hattında asprosin uygulamasının GnRH sekresyon seviyesine etkileri. A) Asprosin 1nM Dozu B) Asprosin 10 nM Dozu C) Asprosin 100 nM Dozu. Veriler Ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (Student's T-Testi)

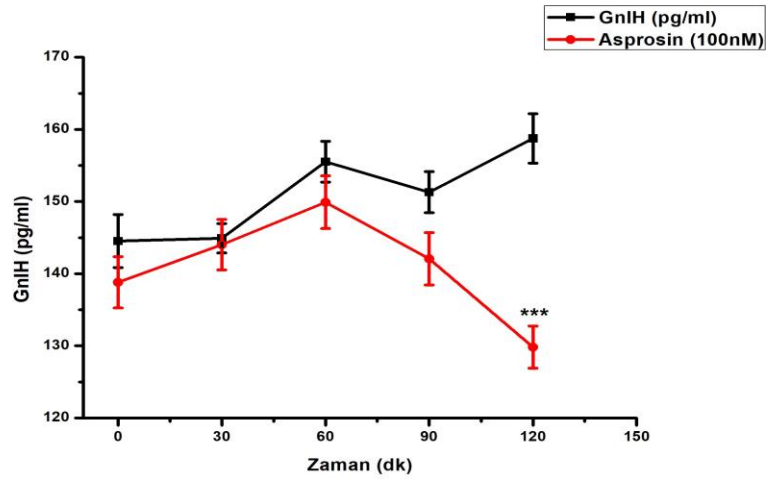
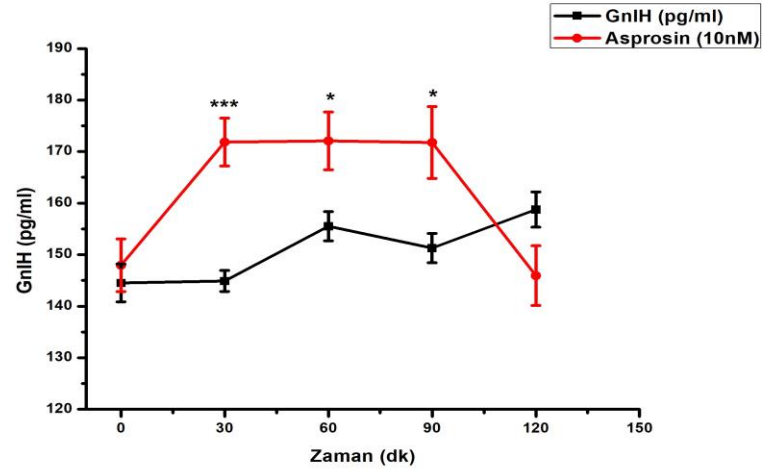
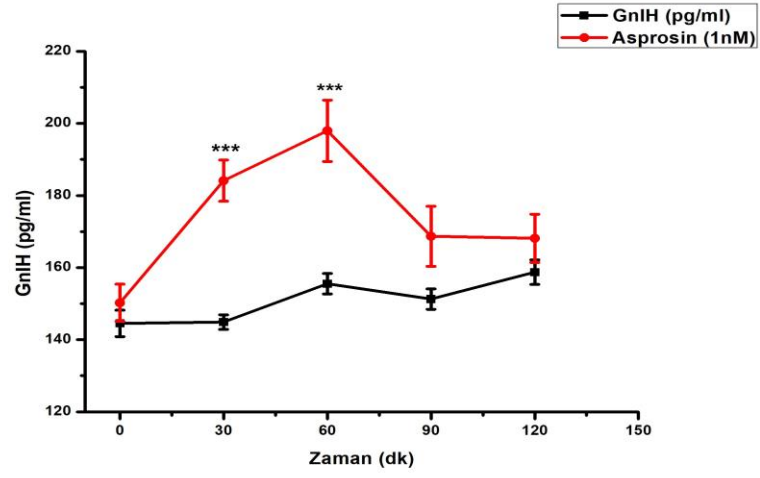
5.1. GnIH Salgılayan Hücre Hatlarında Asprosinin Doz ve Zamana Göre Değişimi

Asprosin hormonu mHypoA50 hücre hatlarındaki GnIH sekresyonunu doz ve zaman bağımlı olarak değişirmiştir.

Asprosin 1 nM dozda uygulandığında GnIH sekresyonu 30. ve 60. dakikada anlamlı bir şekilde artmıştır. 90. ve 120. dakikalarda ise kontrol grubuna kıyasla yüksek seviyelerde seyretmesine rağmen bu fark anlamlı bir seviyeye ulaşmamıştır. ($p = 0,068$, $p=0,240$).

Asprosin 10 nM dozda uygulandığında GnIH sekresyonu 30. 60. ve 90. dakikalarda anlamlı bir şekilde artmıştır. 120. dakikada kontrole kıyasla düşüş gözlemlenmiştir. ($p = 0,086$)

Asprosin 100 nM dozda uygulandığında, 30. dakikada kontrole neredeyse eşit olan GnIH sekresyon seviyesi; 60. Dakikada düşmeye başlamış ($p = 0,252$), 90. dakikada düşüşünü sürdürürken ($p = 0,065$) 120. dakikadaki fark anlamlı seviyeye ulaşmıştır.



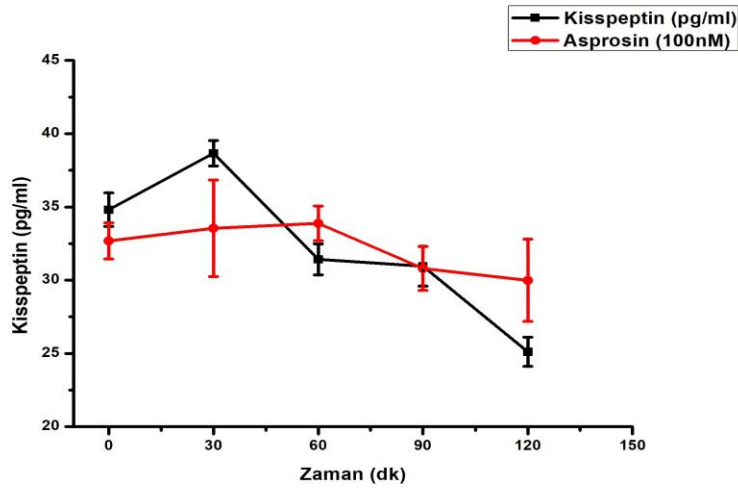
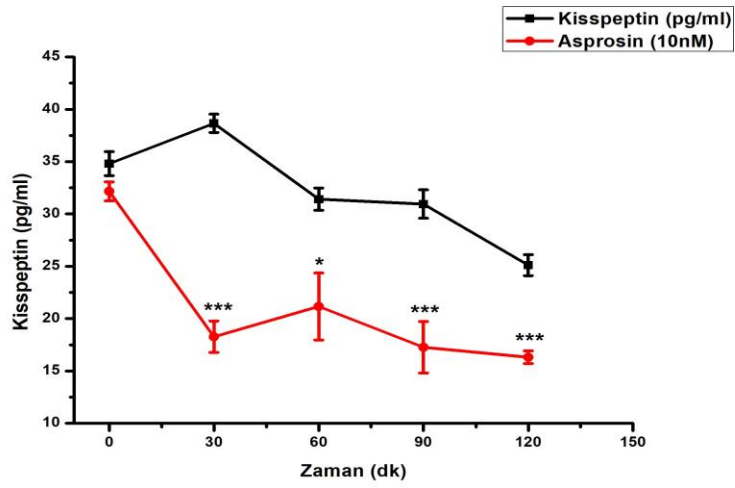
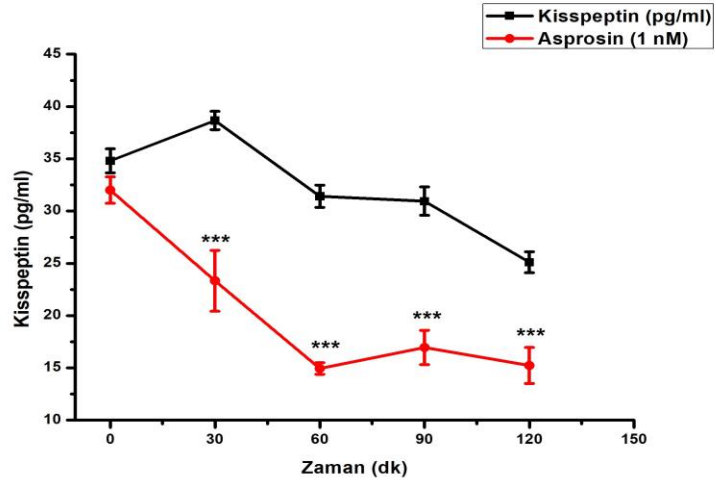
Şekil 16: mHypoA50 hücre hattında asprosin uygulamasının GnIH sekresyon seviyesine etkileri. A) Asprosin 1nM Dozu B) Asprosin 10 nM Dozu C) Asprosin 100 nM Dozu. Veriler Ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (Student's T-Testi)

5.2. Kisspeptin Salgılayan Hücre Hatlarında Asprosinin Doz ve Zamana Göre Değişimi

Asprosin hormonu mHypoA GFP3 hücre hatlarındaki kisspeptin sekresyonunu doz ve zaman bağımlı olarak değiştirmiştir.

Asprosin 1nM ve 10 nM dozlarda uygulandığında kisspeptin sekresyon seviyesi 30., 60., 90. ve 120., dakikalarda anlamlı bir şekilde azalmıştır.

100 nM dozda uygulanan asprosin; kisspeptin sekresyon seviyesini 30. dakikada kontrole göre kısmen düşürürken ($p = 0,135$) 60. dakikada arttırmıştır ($p = 0,152$). 90. dakikada kontrol grubuna neredeyse eşit olan asprosin grubu 120 dakikada kontrole göre artsa da ($p = 0,109$) mevcut farklar herhangi bir anlam ifade etmemektedir.



Şekil 17: mHypoA GFP3 hücre hattında asprosin uygulamasının Kisspeptin sekresyon seviyesine etkileri. A) Asprosin 1nM Dozu B) Asprosin 10 nM Dozu C) Asprosin 100 nM Dozu. Veriler Ort \pm SH olarak gösterilmiştir. (Student's T-Testi)

6. TARTIŞMA

Literatürde enerji metabolizması ve üreme aksıyla ilişkilendirilen asprosin; açlık sırasında beyaz yağ dokusundaki adipositler tarafından salınan bir proteindir (63).

Kocaman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; asprosin karaciğerde hepatositlerde, böbrekte kortikal distal tübül hücrelerinde, kalpte kardiyomiyositlerde, midenin fundusundaki yüzey epitel hücrelerinde, testislerde interstisyel Leydig hücrelerinde ve beyindeki kortikal nöronlarda tespit edildi. Bu çalışma sıçanlarda karaciğer, böbrek, kalp, mide, testis ve beyin dokularında asprosin varlığını bildiren literatürdeki ilk çalışmadır (64).

Maurya ve arkadaşları, asprosinin üreme açısından aktif fare testislerinde Leydig ve Sertoli hücrelerinde lokalize olduğunu ve asprosin-OLFR734 sinyalinin, yaşlı farelerde bir otokrin/parakrin düzenleyici olarak testiküler steroidogenezi ve spermatogenezi desteklediği sonucuna varmışlardır. Yine aynı çalışmada asprosin ve reseptörü OLFR734 ekspresyonunun, fare testisinde yaşlanma sırasında azalan testiküler glikoz ve testosteron seviyeleri ile aynı anda azaldığı görülmüştür (65).

Asprosinin HHG eksenine etkisini incelemek amacıyla yapılan bir invivo çalışmada asprosin uygulamasının kandaki FSH, oksitosin ve estradiol düzeylerini anlamlı olarak artırdığı sonucuna varılmıştır. Ancak HHG eksenini üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar oldukça kısıtlıdır (66). Dolayısıyla asprosinin nöroendokrin üreme aksı üzerindeki etki mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada asprosinin GnRH salınımına direkt etkisini incelemek amacıyla immortal hücre hatları kullanıldı. 1nM ve 10 nM dozdaki asprosin, GnRH salınımını anlamlı bir şekilde azaltırken; 100 nM dozda asprosin uygulaması GnRH salınımını anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Bu bilgiler ışığında asprosinin GnRH nöronlarını doz bağımlı etkilediği ve etkin dozlarda kullanımının üreme eksenini üzerinde hücresel boyutta farklılıklar yaratabileceği sonucuna varılabilir. Ancak bu mekanizmanın daha iyi anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Japon bilimcülerinde keşfedilen GnIH; GnRH-I nöronlarının aktivitesini azaltarak ya da doğrudan gonadotropinler üzerinde etki ederek gonadotropin sentezini ve salınımını inhibe edebilir (67). Çalışmamızda 1nM ve 10 nM dozda asprosin uygulandığında GnIH, GnRH'nın tersi yönünde artarken, 100 nM asprosin uygulamasında ise yine GnRH'nın tersi yönde azalmıştır. Bu durum literatürü destekler niteliktedir.

GnRH nöronları tarafından eksprese edilen G protein-bağımlı reseptörü KISS1R'ye (GPR54 olarak da bilinir) bağlanan kisspeptin, GnRH salınımını ve memeli üreme ekseninin aktivasyonunu uyarır. Kisspeptin nöronları, hem hücre gövdesinde hem de sinir terminallerinde hareket eden GnRH nöronları ile yakın temas kurar (68). Bu bilgilerden hareketle GnRH salınımındaki mevcut değişikliğin kisspeptin salımına da etki edeceği öngörülebilir. Çalışmamızda; asprosin 1nM ve 10 nM dozlarda uygulandığında kisspeptin seviyesi 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda anlamlı bir şekilde azalmıştır.

Mevcut azalmanın GnRH'da da görülmesi, kisspeptinin GnRH aktivatörü olduğunu doğrular niteliktedir. Ancak 100 nM asprosin dozunda görülen GnRH

artışı, kisspeptin hücre hattında görülmemiştir. 100 nM dozda uygulanan asprosin kisspeptin seviyesini 30. dakikada kontrole göre kısmen düşürürken 60. dakikada arttırmıştır. Kisspeptin hücre hattında (100 nM asprosin uygulaması) 90. dakikada kontrol grubuna neredeyse eşit olan asprosin grubu 120 dakikada kontrole göre artsa da mevcut farklar istatistiksel olarak herhangi bir anlam ifade etmemektedir. Bu sonuçlardan hareketle GnRH/Kisspeptin sinyalleşmesinin hücresel boyutta anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması ile; asprosin hormonunun in vitro olarak kisspeptin, GnRH ve GnIH salgılayan immortal hipotalamus hücre hatlarında kisspeptin, GnRH ve GnIH salınması üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan ilk çalışmadır. Bu amaçla yapılan deneysel çalışmalardan asprosinin hipotalamik hücre hatları üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar asprosin hormonunun üreme aksındaki nöroendokrin etkileriyle puberte başlangıcında ve üreme sisteminin merkezi olarak düzenlenmesinde etkin bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Wood C, Lane LC, Cheetham T. Normal physiology (brief overview). *Best Practice&Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2019. 33(3):101265
2. Dye AM, Nelson GB, Diaz-Thomas, A. Delayed Puberty. *Pediatric Annals*. 2018, 47(1), e16–e22.
3. Ortmann O, Weiss JM, Diedrich K. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. *Reprod Biomed Online*; 2002;5 Suppl 1:1-7.
4. Lopez-Rodriguez D, Franssen D, Heger S, Parent AS. Endocrine-disrupting chemicals and their effects on puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2021 Sep;35(5):101579.
5. Kaprio J, Rimpelä A, Winter T, Viken R J, Rimpelä M, Rose R J. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol*. 1995 Oct;67(5):739-53.
6. Hägg U, Taranger J. Maturation indicators and the pubertal growth spurt. *Am J Orthod*. 1982 Oct;82(4):299-309.
7. Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, et al. Kisspeptin -54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(12):6609-15.
8. Macedo DB, Kaiser UB. DLK1, Notch Signaling and the Timing of Puberty. *Semin Reprod Med*. 2019 Jul;37(4):174-181. Epub 2020 Jan 23.
9. Fink G. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: MEMOIR: Harris' neuroendocrine revolution: of portal vessels and self-priming. *J Endocrinol*. 2015 Aug;226(2):T13-24. doi: 10.1530/JOE-15-0130. Epub 2015 May 12.
10. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ et al. Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormones. *Science* 1971;173:1036-8.
11. Melmed S, Williams RH: *Williams Textbook of Endocrinology*, ed 12. Philadelphia, Elsevier/Saunders, 2011, xviii, p 1897.
12. Sasaki K, Norwitz ER. Gonadotropin-releasing hormone/gonadotropin-releasing hormone receptor signaling in the placenta. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18:401-8. doi: 10.1097/MED.0b013e32834cd3b0
13. Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M. The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med* 2002; 8:1421– 26. doi:10.1038/nm801
14. Sakamoto Y, Harada T, Horie S, Iba Y, Taniguchi F, Yoshida S, et al. Tumor necrosis factor--induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:730 –5. doi:10.1210/jc.2002-020666
15. Pierantoni R, Cobellis G, Meccariello R, Cacciola G, Chianese R, Chioccarelli T, et al. Testicular gonadotropin-releasing hormone activity, progression of spermatogenesis, and sperm transport in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1163:279-91. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03617.x.

16. Pazaitou-Panayiotou K, Chemonidou C, Poupi A, Koureta M, Kaprara A, Lambropoulou M, et al. Gonadotropin-releasing hormone neuropeptides and receptor in human breast cancer: correlation to poor prognosis parameters. *Peptides* 2013;42:15-24. doi: 10.1016/j.peptides.2012.12.016
17. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormone in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3874–78.
18. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. Second form of gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:305–9.
19. Fernald RD, White RB. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:224-40. doi: 10.1006/frne.1999.0181
20. Lee VH, Lee LT, Chow BK. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the GnRH gene. *FEBS J* 2008;275:5458-78. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06676.x.
21. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. Second form of gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:305–9.
22. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012
23. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:661-7. doi: 10.1006/bbrc.2000.3350
24. Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen Comp Endocrinol* 2012;177:305-14. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.02.013
25. Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K. Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res* 2003;312:73-9. doi: 10.1007/s00441-003-0700-x
26. McGuire NL, Bentley GE. Neuropeptides in the gonads: from evolution to pharmacology. *Front Pharmacol* 2010;1:114. doi: 10.3389/fphar.2010.00114.
27. Zhao S, Zhu E, Yang C, Bentley GE, Tsutsui K, Kriegsfeld LJ. RFamide -related peptide and messenger ribonucleic acid expression in mammalian testis: association with the spermatogenic cycle. *Endocrinology* 2010;151:617-27. doi:10.1210/en.2009-0978
28. Poling MC, Kauffman AS. Regulation and Function of RFRP-3 (GnIH) Neurons during Postnatal Development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015;6:150. doi: 10.3389/fendo.2015.00150
29. Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol AN, Alreja M. Gonadotropin inhibitory hormone inhibits basal forebrain vGluT2-gonadotropin-releasing hormone neurons via a direct postsynaptic mechanism. *J Physiol* 2009;587(Pt 7):1401-11. doi: 10.1113/jphysiol.2008.166447
30. Harter CJ, Kavanagh GS, Smith JT. The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *J Endocrinol.* 2018;238(3):R173-R183

31. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;37:34631– 34636.
32. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999;1:103 –107.
33. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. From KISS1 to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides* 2009;1:4 – 9.
34. de Roux N, Genin E, Carel JC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;19:10972 –10976.
35. Yuan M, Li W, Zhu Y. Asprosin: A Novel Player in Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Feb 19;11:64. doi: 10.3389/fendo.2020.00064. eCollection 2020.
36. Romere C, Duerschmid C, Bournat J, et al. Asprosin, a fasting-induced glucogenic protein hormone. *Cell*. (2016) 165:566–79. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.063
37. Sakai LY, Keene DR, Renard M, De Backer J. FBN1: the disease-causing gene for marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene*. (2016) 591:279–91. doi: 10.1016/j.gene.2016.07.033
38. Lonnqvist L, Reinhardt D, Sakai L, Peltonen L. Evidence for furin-type activity-mediated C-terminal processing of profibrillin-1 and interference in the processing by certain mutations. *Hum Mol Genet*. (1998) 7:2039–44. doi: 10.1093/hmg/7.13.2039
39. Milewicz DM, Grossfield J, Cao SN et al. A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the marfan syndrome. *J Clin Invest*. (1995) 95:2373–8. doi: 10.1172/JCI117930
40. Lee T, Yun S, Jeong JH, Jung TW. Asprosin impairs insulin secretion in response to glucose and viability through TLR4/JNK-mediated inflammation. *Mol Cell Endocrinol*. (2019) 486:96–104. doi: 10.1016/j.mce.2019.03.001
41. Duerschmid C, He Y, Wang C et al. Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nat Med*. (2017) 23:1444–53. doi: 10.1038/nm.4432
42. Sohn JW. Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Rep*. (2015) 48:229–33. doi: 10.5483/BMBRep.2015.48.4.272
43. Li E, Shan H, Chen L, Long A, Zhang Y, Liu Y, et al. OLF734 Mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin. *Cell Metabol*. (2019) 30:319–28.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.022
44. Acevedo-Rodriguez, A., Kauffman, A. S., Cherrington, B. D., Borges, C. S., Roepke, T. A., & Laconi, M. (2018). Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(10), e12590.
45. Hajer, G. R., van Haefen, T. W., & Visseren, F. L. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29(24), 2959–2971
46. Dupont, J., Pollet-Villard, X., Reverchon, M., Mellouk, N., & Levy, R. (2015). Adipokines in human reproduction. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 24(1), 11–24.
47. Mathew, H., Castracane, V. D., & Mantzoros, C. (2018). Adipose tissue and reproductive health. *Metabolism*, 86, 18–32.

48. Alves, M. G., Martins, A. D., Cavaco, J. E., Socorro, S., & Oliveira, P. F. (2013). Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue barriers*, 1(2), e23992.
49. Grootegoed, J. A., Oonk, R. B., Jansen, R., & van der Molen, H. J. (1986). Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *Reproduction*, 77(1), 109–118.
50. Wales, R. G., Wallace, J. C., & White, I. G. (1966). Composition of bull epididymal and testicular fluid. *Reproduction*, 12(1), 139–144
51. Oliveira, P. F., Alves, M. G., Rato, L., Silva, J. et al. (2011). Influence of 5 α dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. *International Journal of Andrology*, 34(6pt2), e612–e620
52. Rato, L., Alves, M. G., Socorro, S. et al. (2012). Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology*, 9(6), 330–338
53. Rocha, C. S., Martins, A. D., Rato, L. et al. (2014). Melatonin alters the glycolytic profile of Sertoli cells: Implications for male fertility. *Molecular Human Reproduction*, 20(11), 1067–1076
54. Mateus, I., Feijo, M., Espínola, L. M., Vaz, C. V., Correia, S., & Socorro, S. (2018). Glucose and glutamine handling in the Sertoli cells of transgenic rats overexpressing regucalcin: Plasticity towards lactate production. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13
55. Choubey, M., Ranjan, A., Bora, P. S., Baltazar, F., Martin, L. J., & Krishna, A. (2019). Role of adiponectin as a modulator of testicular function during aging in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(2), 413–427.
56. Hameed, W., Yousaf, I., Latif, R., & Aslam, M. (2012). Effect of visfatin on testicular steroidogenesis in purified Leydig cells. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 24(3–4), 62–64.
57. Luo, L., & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 231(3), R77–R99
58. Dupont, J., Pollet-Villard, X., Reverchon, M., Mellouk, N., & Levy, R. (2015). Adipokines in human reproduction. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 24(1), 11–24.
59. Chehab, F. F., Lim, M. E., & Lu, R. (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics*, 12(3), 318–320.
60. Kiezun, M., Smolinska, N., Maleszka, A., Dobrzyn, K., Szeszko, K., & Kaminski, T. (2014). Adiponectin expression in the porcine pituitary during the estrous cycle and its effect on LH and FSH secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307(11), E1038–E1046.
61. Dagklis, T., Kouvelas, D., Kallaras, K., Papazisis, G., Petousis, S., Margioulas, C., Skepastianos, P., & Tarlatzis, B. C. (2015). Leptin increases luteinizing hormone secretion of fasting female rats. *Clin Exp ObstetGynecol*, 42(1), 18–21
62. Maurya, S., & Singh, A. (2022). Asprosin modulates testicular functions during ageing in mice. *General and Comparative Endocrinology*, 323, 114036

63. Wei, F., Long, A., & Wang, Y. (2019). The Asprosin-OLFR734 hormonal signaling axis modulates male fertility. *Cell discovery*, 5(1), 1–3.
64. Kocaman N., Kuloğlu T. Expression of asprosin in rat hepatic, renal, heart, gastric, testicular and brain tissues and its changes in a streptozotocin-induced diabetes mellitus model. *Tissue and Cell*. Volume 66, October 2020, 101397.
65. Maurya S, Singh A. Asprosin modulates testicular functions during ageing in mice. *General and Comparative Endocrinology*. Volumes 323–324, 1 July 2022, 114036.
66. OZ ZD, Ozdede MD, Kocoglu SR et al. ODP428 The Effects of Asprosin Pubertal Maturation in Female Rats. *Journal of the Endocrine Society*, Volume 6, Issue Supplement_1, November-December 2022, Page A669.
67. Mazur-Bialy AI. Asprosin—A Fasting-Induced, Glucogenic, and Orexigenic Adipokine as a New Promising Player. Will It Be a New Factor in the Treatment of Obesity, Diabetes, or Infertility? A Review of the Literature. *Nutrients*, 13(2), 620. doi:10.3390/nu13020620.
68. Colledge WH. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Volume 20, Issue 3, April 2009, Pages 115-121.
69. Ubuka T, Son YL, Bentley GE. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *General and Comparative Endocrinology*. Volume 190, 1 September 2013, Pages 10-17.