TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ERGENLİK DÖNEMİNDEKİ DİŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE YAĞ DOKUSUNDA SPEKSİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ayşe Hande YOZGAT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Deniz BİLLUR

ANKARA

2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ERGENLİK DÖNEMİNDEKİ DİŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE YAĞ DOKUSUNDA SPEKSİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ayşe Hande YOZGAT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Deniz BİLLUR

ANKARA
2024

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta uzmanlık tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Ergenlik Dönemindeki Dişi Sıçanların Ovaryum ve Yağ Dokusunda Speksin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 15.06.2022 tarihinde, 2022-12-115 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşe Hande YOZGAT

Tarih: 31.10.2024

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

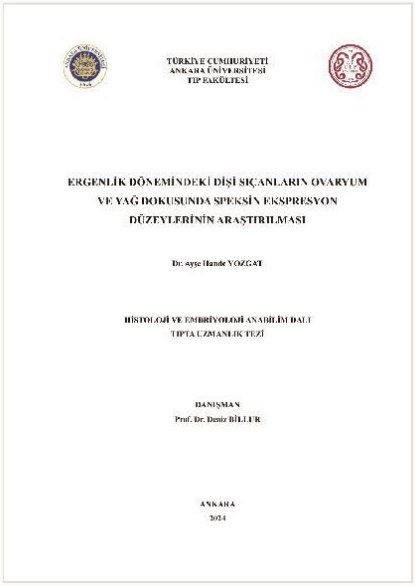
turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Ayşe Hande Yozgat
Ödev başlığı:	Tıpta Uzmanlık Tezi
Gönderi Başlığı:	ERGENLİK DÖNEMİNDEKİ DİŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE YA...
Dosya adı:	Dr.Hande_yozgat_tez_01.11.24_pdf_son_.pdf
Dosya boyutu:	15.29M
Sayfa sayısı:	105
Kelime sayısı:	16,149
Karakter sayısı:	105,456
Gönderim Tarihi:	03-Kas-2024 05:01ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2506501122



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ERGENLİK DÖNEMİNDEKİ DİŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE YAĞ DOKUSUNDA SPEKSİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ayşe Hande YOZGAT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Deniz BİLLUR

ANKARA
2024

ERGENLİK DÖNEMİNDEKİ DİŞİ SIÇANLARIN OVARYUM VE YAĞ DOKUSUNDA SPEKSİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%16 EN	%12	%10	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	**:** Dr. Ayşe Hande YOZGAT	**Sınav tarihi:** 31 / 10 / 2024
Anabilim/Bilim Dalı	**:** Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı	
Tez Danışmanı	**:** Prof. Dr. Deniz BİLLUR	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: Ergenlik Dönemindeki Dişi Sıçanların Ovaryum ve Yağ Dokusunda Speksin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1	☒ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Prof. Dr. Belgin Can
Jüri Başkanı
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Alp Can
Jüri Üyesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Deniz Billur
Jüri Üyesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Obezite, tip 2 diabetes mellitus (T2DM), alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir. Kardiyometabolik hastalıklar için metabolik çerçeve, çocukluk ve ergenlik dönemi kadar erken bir dönemde belirlenir. Speksinin biyolojik işlevleri sınırlıdır ve/veya hâlâ ortaya çıkmaktadır. Speksinin fonksiyonlarının glikoz homeostazı, lipid metabolizması, inflamatuar faktörler, üreme ve beslenme davranışı ile bağlantılı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda puberte döneminde speksinin serum ve doku düzeyinde immunifadelenmesine bakarak, puberte döneminde var olan fizyolojik insülin direnci üzerindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

İyi araştırmacılar, iyi akademisyenler yetiştirmek için gerek bilimsel donanımıyla gerekse sosyal yaşama dair tecrübeleriyle bizlere iyi bir örnek olan, uzmanlık eğitimi ve tez çalışma aşamalarımda bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Deniz Billur' a en içten teşekkürlerimi sunarım. Uzmanlık eğitimim süresince kıymetli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Belgin Can'a, Sayın Prof. Dr. Alp Can' a, Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli' ye, Sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Oya Evirgen'e, Sayın Prof. Dr. Sevim Aydın'a, Sayın Prof. Dr. Özgür Çınar'a ve Sayın Doç. Dr. Ferda Topal Çelikkan'a teşekkür ederim. Asistanlık sürecimde çalışmaktan mutluluk duyduğum, bölümümüz asistanları Araş. Gör. Dr. İrem İnanç, Araş. Gör. Dr. Rukiye Kaya, Dr. Bahar Şahin Cansoy, Dr. Ekin Baysal, Uzm. Dr. Bilge Serdaroğlu, Uzm. Dr. Fatma Mert, Dr. İbrahim Alptekin, Dr. İrem Saadet Odabaş, Dr. İrem Önen, Dr. Atakan Sağlam, Dr. Nursena Tütüncü, Dr. Durul Şeyma Şen, Dr. Elif Öztürk, Doktora öğrencisi Gamze Doğan, Yüksek Lisans Öğrencisi Ezel Erkan ve Elmas Yaren Suiçmez'e; bölümümüz personeli Serap Batı, Abdülkerim Dilbaz, Remzi Ata, Erdoğan Çalışkan, Seyfettin Ülger ve Sonay Yeter' e destekleri için teşekkür ederim. Çalışmamıza katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Biyokimya Anabilim Dalı' ndan Prof. Dr. Berrin İmge Ergüder'e teşekkür ederim.

Meslek hayatım ve eğitimimin her aşamasında yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TTU-2023-2764 numaralı projeyle destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii
Özgünlük Raporu iii
Kabul Onay Sayfası iv
Önsöz v
İçindekiler vi
Simgeler ve Kısaltmalar viii
Şekiller Dizini x
Tablolar Dizini xv

1. ÖZET 1
2. ABSTRACT 3
3. GİRİŞ – AMAÇ 5
4. GENEL BİLGİLER 7
4.1. Ovaryum Histolojisi 7
4.2. Foliküler Gelişim 8
4.3. Ovulasyon 11
4.4. Ovaryum Embriyolojisi 14
4.5. Beyaz Yağ Dokusu Histolojisi 16
4.6. Yağ Dokusu Embriyolojisi 17
4.7. Speksin (SPX) 18
4.8. İnsanda Ergenlik Dönemi 20
4.9. Sıçanda Ergenlik Dönemi 21
5. GEREÇ ve YÖNTEM 24
5.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Süreci 24
5.1.1. Antropometrik Ölçümler 25
5.1.2. Puberte Tayini 25
5.1.3. Vajinal Yıkama ile Vajinal Yayma Yapılması 26
5.1.4. Vajinal Yaymanın Hematoksilin-Eosin ile Boyanıp, Östrus Siklusunun Değerlendirilmesi 27
5.2. Vajinal Smear Örnekleri ile Östrus Döngüsü Değerlendirilmesi 27
5.3. Ovaryum ve Beyaz Yağ Dokusunun Alınması ve Histolojik Takibi 28
5.4. Işık Mikroskobik (IM) İncelemeleri İçin Doku Takibi 29
5.4.1. Ovaryum Dokusu ve Bouin Takibi 29
5.4.2. Yağ Dokusu %10 Fosfat Tamponlu Formalin Takibi 30
5.4.3. Hematoksilin-Eozin (HE) Boyama Prosedürü 30

5.4.4. İmmünohistokimya İçin İşaretleme Prosedürü 31
5.4.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme 31
5.5. Geçirimli (Transmisyon) Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülemesi İçin Yapılan Çalışmalar 32
5.5.1. İnce Kesit Boyama Protokolü 33
5.6. Biyokimyasal Analiz 34
5.7. HOMA-ID (İnsülin Direnci) Hesaplanması 34
5.8. İstatistiksel Analiz 34
6. BULGULAR 36
6.1. Sıçanların Sakrifikasyon Ağırlıkları, Δ Ağırlık/ilk Ağırlık Değerleri, Vajinal Açıklık Zamanları ve Serum Hormon Düzeylerinin Değerlendirilmesi 36
6.2. Hematoksilin- Eozin ile Ovaryum ve Beyaz Yağ Dokusunun Değerlendirilmesi 44
6.3. İmmunhistokimya için Boyama Değerlendirmesi 50
6.3.1. Ovaryum Dokuısu Pozitif SPX İmmunboyama İfadelenmesi 50
6.3.2. Beyaz Yağ Dokusu Pozitif ve Negatif SPX İmmunboyama İfadelenmesi 66
6.3.3. Beyaz Yağ Dokuısu Pozitif SPX İmmunboyama İfadelenmesi 67
6.3.4. Ovaryum ve Beyaz Yağ Dokusunda SPX Pozitifliğinin Gruplar Arasında İmmünhistokimyasal Değerlendirmesi 68
6.3.4.1. Ovaryum Dokusu ve Beyaz Yağ Dokusu Pozitif SPX Boyanma Yoğunluğu Analizi 71
6.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları 73
7. TARTIŞMA 87
8. SONUÇ ve ÖNERİLER 93
9. KAYNAKLAR 95

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgRP : Agouti-ilişkili Protein

α-MSH : α-Melanosit Stimüle edici Hormon

AMH : Anti-Müllerian Hormon

BMI : Vücut Kitle İndeksi

CART : Kokain ve Amfetamin ile ilişkili Hormon

DAB : 3,3-diaminobenzidine

d H2O : Distile Su

dk : Dakika

Δ : Delta

E2 : Östrodiol

FSH : Folikül Uyarıcı Hormon

GAL : Galanin

GnRH : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

HE : Hematoksilin Eozin

HFD : Yüksek Yağlı Diyet

HOMA-ID : İnsülin Direnci

HPA : Hipotalamo-Pituiter-Adrenal

HPG : Hipotalamo-Pituiter-Gonad

HRP : Horseradish Peroxidase

IGF-1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IHC : İmmünohistokimya

KISS : Kisspeptin

LH : Lüteinizan Hormon

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

µIU : Mikro İnternasyonel Ünit

µl : Mikrolitre

mL : Mililitre

NAFLD : Alkolsüz Yağlı Karaciğer Hastalığı

ND : Normal Diyet

ng : Nanogram

NPY : Nöropeptid Y

ºC : Santigrat Derece

OMI : Ovosit Maturasyon İnhibitörü

PBS : Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)

PCOS : Polikistik Over Sendromu

pg : Pikogram

PNG : Postnatal Gün

SPX : Speksin

T2DM : Tip 2 diabetes mellitus

TEM : Transmisyon Elektron Mikroskobu

% : Yüzde

ZP : Zona Pellusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ovaryum dokusunun korteksine ait şematik çizimde farklı gelişim aşamalarında primer ve primordiyal foliküller izlenmektedi 10

Şekil 2. Ovaryum dokusuna ait kesitte Graaf folikülü izlenmektedir - Mallory Azan Boyası 11

Şekil 3. Menstrüel siklusta hipotalamus, hipofiz bezi, ovaryum ve endometrium arasındaki ilişkinin gösterimi 12

Şekil 4. Ovaryum siklusunun şematik gösterimi 13

Şekil 5. Gonadal farklanmanın morfolojisi. 15

Şekil 6. Genital sistemin farklılaşmasında yer alan faktörler 16

Şekil 7. Adiposit türevli SPX, insülin sekresyonunu, düşük dereceli inflamasyonu ve insülin direncini hafifletmek için lipogenezi azaltır, GLUT4 ekspresyonunu ve translokasyonunu teşvik ederek iskelet kasında lipolizi, glikoz alımını ve insülin duyarlılığını arttırır 19

Şekil 8. İştahı düzenleyen NPY/AgRP ve POMC nöronlarının yanı sıra GnRH nöronları,besin ve enerji durumunun periferik sinyallerinden etkilenir. GnRH, yukarı akışlı kisspeptin ve GAL nöronları tarafından da düzenlenir. NPY/AgRP, POMC ve oreksin nöronları enerji homeostazında yer alır ve bu besleme devresinden gelen çıktılar, üremeyi modüle etmek için GnRH nöronlarını besleyebilir. Ayrıca, peptit SPX, enerji homeostazının ve üremenin birbirine bağlı koordinasyonunda yer alır. Periferik SPX, beslenmeyi indüklemek veya bastırmak için NPY/AgRP ve/veya POMC nöronlarını modüle edebilir ve bu besleme devresinden gelen uyarılar, üremeyi modüle etmek için GnRH nöronlarını stimüle edebilir. SPX, üreme ve enerji homeostazını kontrol etmek için bu hipotalamik nöronları doğrudan veya dolaylı olarak modüle edebilir 20

Şekil 9. A**.** İnsan üreme menstrüel döngüsü 28 gün sürer ve ovulasyon 14. günde gerçekleşir. Vajinal kanamanın ilk günü 1. gündür. Döngünün ilk aşaması, E_2 ve progesteron seviyelerinin çok düşük olduğu foliküler fazdır. Yaklaşık 12. günde, E_2 seviyeleri yükselir ve hipofiz LH ve FSH salgılanmasının artmasına neden olur, seviyeler 14. günde zirve yapar. Bu LH/FSH dalgalanması ovulasyon, ovaryum E_2'ün sürekli yükselmesi ve progesteron seviyelerinde yeni bir artışla sonuçlanır. Luteal faz olarak adlandırılan ovulasyon sonrası dönemde östrojen ve progesteron seviyeleri önce yükselir, ardından çok düşük seviyelere geriler ve bu noktada bir sonraki menstrüel dönem başlar. B. Sıçan üreme döngüsü insan döngüsünden çok daha kısadır ve 4 ila 5 günden oluşur. Progesteron, 2. günde postovulasyon fazının (yani diöstrus*) başlarında keskin bir şekilde artar ve 2. günde geç diöstrusta keskin bir şekilde düşer. Foliküler fazın (yani proöstrus**) başladığı yaklaşık öğlen saatlerinde östrojen seviyeleri belirgin bir şekilde yükselir ve proöstrusun yaklaşık 4'ü ile 6'sı arasında LH ve FSH'nin hızlı bir şekilde zirve yapmasına ve progesteron salgısının artmasına neden olur. İnsanlarda olduğu gibi, gonadotropin dalgalanması ovulasyonu tetikler. Tüm bu hormonlar 4. günde ovulasyon gerçekleştiğinde (yani östrus) başlangıç seviyelerine döner. Son olarak östrus akşamı kısa süreli geçici bir E_2 zirvesi yaşanır 22

Şekil 10. A.Farede yaşamın farklı dönemlerinde gonadotrop ekseninin düzenlenmesi. FSH (yeşil çizgi) ve LH (mavi çizgi). Doğumdan sonra maternal östradiol yavru serumundan azalır ve bu durum östradiol negatif geri bildiriminin kaybolmasına ve mini puberte döneminde gözlenen gonadotropin seviyelerinde dramatik artışa yol açabilir. Mini pubertede gonadotropin artışı ovaryum tarafından östradiol üretiminin artmasına katkıda bulunur (sürekli pembe çizgi). Bundan sonra, doğumdan sonra alfa-fetoprotein (AFP)'deki azalma ve inhibin negatif geri bildiriminin olgunlaşması, ergenliğe kadar düşük kalan gonadotropin seviyelerinde gözlenen düşüşe katkıda bulunabilir. Üreme hayatı boyunca, gonadotropin seviyeleri hem estradiol negatif hem de pozitif geri bildirim ile düzenlenir. Yaşlı farelerde östradiol negatif geri bildirimi zayıflar, böylece gonadotropin seviyeleri artar. B.Farede prepubertal dönemin farklı aşamaları; yenidoğan, infantil ve juvenil dönemleri gösterilmektedir. Mini puberte infantil dönem içinde gerçekleşir. C.Östrus döngüsünün farklı aşamalarında prepubertal ve yetişkin dişi farelerde gonadotropin ve östradiol seviyeleri, postnatal 27.güne kadar bakılmış ve sonrasında prosöstrus, östrus ve diöstrus dönemlerinde analiz edilmiştir. İnfantil döneme ait hormon seviyeleri mavi çubuklarla gösterilmiştir 23

Şekil 11. PNG (postnatal gün) 21 ve PNG 28 arası 10 adet yüksek yağlı yem ve 10 adet normal yem ile beslenen, PNG 21 ve PNG 42 arası 10 adet yüksek yağlı yem ve 10 adet normal yem ile beslenen, PNG 21 ve PNG 70 arası 10 adet yüksek yağlı yem ve 10 adet normal yem ile beslenen toplam 60 adet dişi sıçan kullanıldı. PNG 21-28: Puberte öncesi dönem, PNG 21-42: Puberte dönemi, PNG 21-70: Puberte sonrası dönem olarak gruplar belirlendi. 24

Şekil 12. Sıçanlarda vajinal açıklığa bakılması. 26

Şekil 13. Vajinal açıklık saptanan sıçanlardan vajinal smear alınması. 27

Şekil 14. Wistar Albino Sıçanlarda Östrus Döngüsünün farklı dönemlerine ait vajinal smear örnekleri izlenmektedir. 28

Şekil 15. Deney gruplarına ait sıçanlardan ovaryum ve yağ dokusunun alınması. 29

Şekil 16. Image J programı ile boyanma yoğunluğu ölçülerek SPX protein ekspresyonu (%) değerinin belirlenmesi. 32

Şekil 17. Sıçanların beslenme ile ilişkili puberte zamanı (vajinal açıklık) ve ΔAğırlık/İlk ağırlık ilişkisi gruplar arasında grafi ile ifade edilmiştir. 36

Şekil 18. Sıçanların HOMA-ID değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir. 37

Şekil 19. Sıçanların serum speksin ve kisspeptin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir. 40

Şekil 20. Sıçanların serum leptin ve s-leptin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir. 40

Şekil 21. Sıçanların serum LH (Luteinizan Hormon) ve Östrodiol (E_2) düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir. 40

Şekil 22. Spearman (rho) korelasyon analizleri grafi ile ifade edilmektedir. 43

Şekil 23. Tek katlı yassı folikül hücreleri ile primordiyal folikül (ok), tek katlı kübik veya prizmatik folikül hücreleri ile primer folikül (kırmızı ok), antrum sıvı birikimi ile (kırmızı ok başı) sekonder folikül ve (siyah ok başı) kümülüs ooforus ile olgun graaf folikül izlenmektedir. Hematoksilin Eozin, x10 objektif, Bar: 200 μm 45

Şekil 24. Puberte dönemine ait normal yem ile beslenen sıçandan elde edilen ovaryum dokusunda korpus luteum (asteriks) ve atretik folikül (ok) izlenmektedir. Hematoksilin Eozin, X10 objektif, Bar: 200 µm 46

Şekil 25. Deney gruplarından elde edilmiş ovaryum dokusuna ait mikrograflar izlenmektedir. Hematoksilin- Eozin, x10 objektif. Bar: 200 µm 47

Şekil 26. Postpuberte dönemine ait normal yem ile beslenen sıçanlardan elde edilen subkutan beyaz yağ dokusu kesiti izlenmektedir, Hematoksilin Eozin, X40 objektif, Bar: 50 µm. 48

Şekil 27. Deney gruplarından elde edilmiş beyaz yağ dokusuna ait mikrograflar izlenmektedir, Hematoksilin Eozin, X40 objektif, Bar: 50 µm. 49

Şekil 28. Ovaryum dokusuna ait SPX pozitif ve negatif immünboyama ifadesine ait mikrograflar izlenmektedir, X40 objektif, Bar: 50 µm. 50

Şekil 29. Prepuberte dönemi, normal yem ile beslenen gruba ait SPX pozitifliği kahverengi boyanma şeklinde geç primer folikülde ovosit sitoplazmasında (asteriks), granüloza hücreleri (kırmızı ok) ve teka hücrelerinde (siyah ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 51

Şekil 30. Prepuberte normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (ok başı), ovosit sitoplazması(ok), granüloza hücreleri (içi dolu asteriks) ve teka hücreleri (içi boş asteriks) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 52

Şekil 31. Prepuberte normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok başı) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. ... 53

Şekil 32. Puberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) erken primer folikül (ok başı) ile gösterilmiştir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 54

Şekil 33. Puberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) geç primer folikül granüloza hücreleri (ok başı), teka hücreleri (içi boş ok) ve ovosit (içi boş asteriks) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 55

Şekil 34. Puberte dönemi, normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda, SPX (+) korpus luteumda granüloza lutein hücresi (siyah ok) ve fibrosit (kırmızı ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 56

Şekil 35. Postpuberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) erken primer folikül (ok başı) ile gösterilmiştir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 57

Şekil 36. Postpuberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) geç primer folikül granüloza hücreleri (boş asteriks) ve teka hücreleri (içi boş ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 58

Şekil 37. Prepuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20µm. 59

Şekil 38. Prepuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok) ile erken primer folikül (ok başı) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20µm 60

Şekil 39. Puberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) erken primer folikül (içi boş ok) ve ovosit (içi boş asteriks) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 61

Şekil 40. Puberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok), granüloza hücreleri (içi boş asteriks) ve teka hücreleri (ok başı) mikrografı izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 62

Şekil 41. Postpuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) sekonder folikülde ovosit sitoplazması (içi boş asteriks), granüloza hücreleri (içi boş ok) ve teka hücreleri (ok başı) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 63

Şekil 42. Postpuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) korpus luteumda granüloza lutein hücresi (ok başı) ve fibrosit (içi boş asteriks) ve lipit damlacıkları (ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 64

Şekil 43. Deney gruplarından elde edilmiş ovaryum dokusu geç primer foliküllerin SPX (+) immunifadelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm. 65

Şekil 44. Beyaz yağ dokusuna ait SPX pozitif ve negatif immünboyama ifadesine ait mikrograflar izlenmektedir, X40 objektif, Bar: 50 µm. 66

Şekil 45. SPX (+) beyaz yağ dokusuna ait mikrograf izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm 67

Şekil 46. Deney gruplarından elde edilen ovaryum dokusu SPX (+) immun ifadelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir, x40 objektif, Bar: 50µm. 69

Şekil 47. Deney gruplarından elde edilen beyaz yağ dokusu SPX (+) immun ifadelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir, x40 obkejtif, Bar: 50 µm. 70

Şekil 48. Sıçanların ovaryum dokusu SPX immunboyama ifadesinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile gösterilmiştir. 71

Şekil 49. Sıçanların beyaz yağ dokusu SPX immunboyama ifadesinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile gösterilmiştir 72

Şekil 50. Prepuberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda ovosit sitoplazması (asteriks), zona pellusida (ok başı), granüloza hücresi (ok) ve antral boşluk (boş ok) izlenmektedir. 3000 büyütme, Bar: 5 µm 73

Şekil 51. Prepuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu folikül sıvısı (siyah asteriks) ve granüloza hücresi çekirdeği (kırmızı asteriks) izlenmektedir.5000 büyütme, Bar: 2 µm 74

Şekil 52. Puberte dönemi, normal yem ile beslenen grup, ovaryum dokusunda mitokondriyon (siyah ok), ovosit mikrovillusları (kırmızı ok) ve zona pellusida (asteriks) izlenmektedir. 8000 büyütme, Bar: 2 µm 75

Şekil 53. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresinde mitokondriyon (içi boş asteriks), granülsüz endoplazma retikulumu (ok) ve lipit damlacıkları (ok başı) izlenmektedir. 12000 büyütme, Bar: 1 µm 76

Şekil 54. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda granüloza hücresi (içi boş asteriks), teka hücresi (içi dolu asteriks), ve endotel çekirdeği (ok) izlenmektedir. 4000 büyütme, Bar: 5 µm 77

Şekil 55. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda antral boşluk (asteriks), granüloza hücresi (ok başı), bazal lamina (ok) ve teka hücresi (içi boş ok) izlenmektedir. 3000 büyütme, Bar: 5 µm 78

Şekil 56. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda ovosit sitoplazması(asteriks) granüloza hücresi (ok başı) ve teka hücresi (ok) izlenmektedir. 2000 büyütme, Bar: 10 µm 79

Şekil 57. Puberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu folikül sıvısı(asteriks), granüloza hücresi (ok), teka hücresi (kırmızı asteriks) ve lipit damlacıkları (kırmızı ok) izlenmektedir. 1500 büyütme, Bar: 10 µm 80

Şekil 58. Postpuberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresi tübüloveziküler mitokondriyon (siyah ok), mitokondriyon kristası (kırmızı ok) ve mitokondriyon çift katlı membranı (ok başı) izlenmektedir.30000 büyütme, Bar: 500 nm 81

Şekil 59. Postpuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresi (siyah asteriks), granüllü endoplazma retikulum (siyah ok), teka hücresi (kırmızı asteriks) ve lipit damlacıkları (kırmızı ok) izlenmektedir. 5000 büyütme, Bar: 2 µm 82

Şekil 60. Postpuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresi granüllü endoplazma retikulumu (kırmızı ok), tübüloveziküler mitokondriyon (siyah ok) ve granüloza hücresinin çekirdeği (kırmızı asteriks) izlenmektedir. 15000 büyütme, Bar: 1 µm 83

Şekil 61. Postpuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücre çekirdeği (siyah asteriks), tübüloveziküler mitokondriyon (siyah ok), granüllü endoplazma reikulumu (ok başı) ve foliküler sıvı (kırmızı asteriks) izlenmektedir. 12000 büyütme, Bar: 1 µm 84

Şekil 62. Ovaryum dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesi ile ovosit (O), zona pellusida (ZP), granüloza hücresi (GH), teka hücresi (TH) ve foliküler sıvı (FS) farklı büyütmelerde gösterilmiştir. Sırasıyla Bar: 10 µm, 6 µm, 10 µm ve 2 µm. .. 85

Şekil 63. Deney gruplarından elde edilmiş beyaz yağ dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir. Bar: 10 µm. 86

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Beyaz Yağ Dokusunun Özellikleri 17

Tablo 2. Deney Grupları 25

Tablo 3. Normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanlarda vajinal açıklık zamanları, sakrifikasyon ağırlığı, Δ ağırlık/ilk ağırlık değerleri ve HOMA-ID değerlerine ait gruplar arası istatistiksel veriler 38

Tablo 4. Deneklerde serum hormon seviyelerine ait gruplar arası istatistiksel veriler 41

Tablo 5. Sıçanların ovaryum ve beyaz yağ dokusu SPX immunboyama ifadelenmesi 72

1. ÖZET

Ön bilgi: Spexin (SPX) ve kisspeptin (KISS) vücut ağırlığı, metabolizma ve üremenin düzenlenmesinde rol oynayan peptitlerdir.

Amaç: Çalışmanın amacı, dişi Wistar Albino sıçanların serum SPX konsantrasyonlarıyla, ovaryum ve beyaz yağ dokusundaki SPX ekspresyon seviyelerinin pubertal dönemlerle ilişkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: 60 adet Wistar Albino sıçan, prepubertal (n=20) (postnatal gün [PNG] 28), pubertal (n=20) (PNG 42) ve postpubertal (n=20) (PNG 70) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Tüm sıçanlar PNG21'e kadar anne sütü ile beslenmiş olup, sonrasında her grup kendi içinde normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen iki alt gruba ayrıldı. Pubertenin belirlenmesi için vajinal açıklık, ilk östrus ve ovaryum dokusunda korpus luteum histomorfolojik olarak gösterildi. Serum LH, östrodiol (E2), total Ieptin (Iep), soluble leptin reseptörü (s-IepR), SPX, kisspeptin (KISS), IGF1, açlık glikoz ve insülin seviyeleri (HOMA-İnsülin direnci (ID)= glikoz (mmol/L) x insülin (μIU/mL) / 22,5) ve SPX ekspresyonları immünhistokimya boyama ile incelendi. İstatistiksel analizlerde $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Ağırlıktaki değişimin doğum ağırlığına oranı normal ve yüksek yağlı yem gruplarında pubertal ve postpubertal dönemde prepubertal döneme göre beklendiği gibi anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Normal yemle beslenen gruplarda; serum LH düzeyleri postpubertal sıçanlarda pubertal ve prepubertal gruba göre anlamlı düşük saptandı (sırasıyla $p=0.006$ ve $p=0.002$). Serum E2 ve IGF1 seviyeleri benzerdi ($p>0.05$). Serum SPX ve KISS seviyeleri pubertal grupta prepubertal gruba göre anlamlı derecede düşük izlendi (sırasıyla $p=0.029$ ve $p=0.007$). HOMA-ID pubertal dönemde prepubertal döneme göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p= 0.018$). Serum s-lepR seviyeleri puberte dönemi, prepuberte ve postpuberte dönemlerine göre anlamlı düşük izlendi (sırasıyla $p=0.010$ ve $p=0.003$). Serum SPX seviyeleri serum KISS ile anlamlı olarak korelasyon gösterdi ($r=0.510$, $p=0.008$). Yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda; serum SPX, KISS ve leptin düzeyleri pubertal grupta prepubertal gruba göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p = 0.003$, $p<0.001$ve $p = 0.002$). Serum LH ve E_2 pubertel dönemde prepuberte dönemine göre anlamlı düşük saptandı (her ikisi için $p = 0.001$). HOMA-ID pubertal dönemde prepubertal döneme göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p= 0.030$). Normal yem ile beslenen sıçanlarda ovaryum dokusu SPX boyanma yoğunluğu prepuberte dönemi ile puberte ve postpuberte dönemleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.009$). Normal yem ile beslenen sıçanlarda

beyaz yağ dokusu SPX boyanma yoğunluğu prepuberte dönemi ile puberte ve postpuberte dönemleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdi (sırasıyla $p=0.019$ ve $p=0.002$). Yüksek yağlı yem gruplarında ovaryum ve beyaz yağ dokusunda prepuberte döneminden puberte dönemine geçişte anlamlı artış ve puberteden postpuberteye geçişte anlamlı azalma saptandı (her ikisi için $p<0.001$).

Sonuç: Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, dişi pubertal sıçanlarda serum ve doku düzeyinde SPX seviyelerinin azaldığını gösteren ilk çalışmadır. Normal yem ile beslenen sıçanlarda ovaryum ve beyaz yağ dokusunda speksin boyanma yoğunluğunun puberte döneminde prepuberte dönemine göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adipokin; Hipotalamus-hipofiz-gonad (HPG) Ekseni; Puberte; Speksin

2. ABSTRACT

Background: Spexin (SPX) and kisspeptin (KISS) are peptides involved in the regulation of body weight, metabolism and reproduction.

Objective: This study aimed to investigate the relationship between serum SPX concentrations and SPX expression levels in the ovary and white adipose tissue of female Wistar Albino rats across prepubertal, pubertal, and postpubertal stages.

Materials and Methods: Sixty Wistar Albino rats were divided into three groups by age: prepubertal (n=20, PND 28), pubertal (n=20, PND 42), and postpubertal (n=20, PND 70). Each group was subdivided into two diet-based subgroups: one fed a normal diet and the other a high-fat diet. All rats were initially breastfed until PND 21. Puberty markers, including vaginal opening, first estrus, and corpus luteum presence in ovarian tissue, were observed histomorphologically. Serum LH, estradiol (E2), total Ieptin (Iep), soluble lep receptor (s-IepR), SPX, kisspeptin (KISS), IGF1, fasting glucose and insulin levels (HOMA- Insulin resistance (IR)= glucose (mmol/L) x insulin (μIU/mL) / 22,5) and SPX expressions were analysed by immunohistochemistry staining. In statistical analyses, $p < 0.05$ was considered significant.

Results: The ratio of change in weight to birth weight was found to be significantly higher in the pubertal and postpubertal periods in normal and high fat diet groups compared to the prepubertal period ($p<0.001$). Serum LH levels were significantly lower in postpubertal rats compared to pubertal and prepubertal rats in normal diet groups ($p=0.006$ and $p=0.002$, respectively). Serum E2 and IGF1 levels were similar ($p>0.05$). Serum SPX and KISS levels were significantly lower in the pubertal group compared to the prepubertal group ($p=0.029$ and $p=0.007$, respectively). HOMA-IR was significantly elevated during puberty compared to prepuberty ($p=0.018$). Serum s-lepR levels were lower in pubertal rats than in both prepubertal and postpubertal rats ($p=0.010$ and $p=0.003$, respectively). A positive correlation was found between serum SPX and KISS levels ($r=0.510$, $p=0.008$). In high-fat diet groups, serum SPX, KISS, and leptin levels were lower in pubertal rats than in prepubertal ones ($p=0.003$, $p<0.001$, and $p=0.002$, respectively). Serum LH and E2 levels were also reduced in pubertal rats compared to prepubertal ones ($p=0.001$ for both). HOMA-IR was significantly higher during puberty than in the prepubertal period ($p=0.030$). The SPX staining intensity in ovarian tissue for rats on a normal diet was significantly different between prepubertal and both pubertal and postpubertal stages ($p<0.001$ and $p<0.009$, respectively). In white adipose tissue, SPX staining intensity varied significantly across prepubertal, pubertal, and postpubertal stages ($p=0.019$ and $p=0.002$, respectively) in the normal diet groups. In the high fat diet groups, SPX staining in

both ovarian and adipose tissues increased from prepuberty to puberty and then decreased from puberty to postpuberty ($p<0.001$ for both).

Conclusion: To the best of our knowledge, this is the first study showing that the SPX level decreased in the serum and tissue of female pubertal rats. It was shown that the intensity of SPX staining in the ovary and white adipose tissue significantly decreased during puberty compared to prepuberty in rats fed a normal diet.

Keywords: Adipokine; Hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis; Puberty; Spexin

3. GİRİŞ – AMAÇ

Puberte döneminde pulsatil olarak gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanması, hipofizden gonadotropin salgılanmasını ve gonadal olgunlaşmayı sağlar. Çocukluk çağı obezitesinde son zamanlarda gözlenen artış, yağlanmanın pubertal gelişim üzerindeki etkilerini araştırma gerekliliğini ortaya koymuştur. Özellikle kızlarda çocukluk çağı obezitesinin erken puberte başlangıcı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [1]. Epidemiyolojik ve genetik bağlantılara rağmen, obezite ile ilişkili erken pubertal başlangıcın altında yatan kesin mekanizma(lar) belirsiz kalmıştır. Obezitenin, ergenliğin meydana geldiği yaş da dahil olmak üzere kızlarda erken ergenliğe katkıda bulunduğu gösterilirken erkeklerde, ergenlik zamanlaması ve obezite ilişkisi hakkında kesin kararlar vermek için karşılaştırılabilir veriler yetersizdir [2].

Speksin (SPX), obezitenin neden olduğu insülin direnci ve T2DM'nin patofizyolojisinde önemli rol oynayan bir adipokindir. Adipoz dokular endokrin bir organ olarak kabul edilir. Adipokinler yağ dokusunda glikoz ve lipid metabolizmasını düzenler ve otokrin, parakrin veya endokrin mekanizmalar ile hedef dokuda etki gösterir [3]. Speksinin yağ dokusundaki seviyelerinin dolaşımdaki seviyeleri ile ilişkili olduğu görülmektedir, bu da insüline duyarlı dokularda lipid ve glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde kapsamlı bir endokrin rolü vurgulamaktadır. Metabolik bozukluklar (örneğin, obezite ve inflamasyon) devam ettiğinde, yağ dokusunda speksinin ekspresyonu azalır ve bu koruyucu etki düzensiz hâle gelir, yağ dokusunu ve iskelet kasını insülin direncine duyarlı hâle getirir [4] . SPX, enerji homeostazında yer alan nöronların modülasyonu yoluyla GnRH salgılanmasını dolaylı olarak düzenleyebilir. Nöropeptid Y (NPY), agouti-ilişkili protein (AgRP), kokain ve amfetamin ile ilişkili hormon (CART) ve α-melanosit stimüle edici hormon(α-MSH), dişi farelerin hipotalamusundaki GnRH aktivitesini modüle eder [5]. Bununla birlikte, mevcut literatür bilgileri kapsamında fonksiyonel speksinin GnRH nöronlarında eksprese edilip edilmediği veya bunlardan salgılanıp salgılanmadığı bilinmemektedir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır [6].

Çalışmamızda çocukluk çağı obezitesi ile erken puberte arasındaki ilişkide speksinin olası rolünün araştırılması amacıyla yüksek yağlı diyet ile beslenen ve ergenlik döneminde bulunan dişi sıçanların ovaryum ve yağ dokularında histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle speksin düzeyleri araştırılmıştır. Çalışmanın birincil amacı ovaryum ve yağ dokusunda histolojik yöntemlerle SPX ifadelenmesinin puberte öncesi, puberte ve puberte sonrası dönemde incelemek, ikincil amacı SPX ve puberte ilişkili laboratuvar değişkenlerinin olası ilişkisini

araştırmaktır. Sıçanlarda SPX ve puberte arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmamızın ileri çalışmalar için bir temel olacağını öngörmekteyiz.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar nulliparlarda pembemsi beyaz renkli, 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında yapılardır. Her ovaryum, mezovaryum denen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posteriyor yüzeyine bağlanır. Süperiyor kutbu, ovaryumun sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır, inferiyor kutbu ise ovaryan ligament tarafından uterusa bağlanır. Ovaryumun yüzeyi tek katlı kübik ve bazı bölgelerinde yassı epitel ile döşenmiştir. Germinal epitel olarak isimlendirilen bu tabaka mezovaryumu kaplayan mezotelyum ile devamlılık göstermektedir. Germinal epitel ile korteksin arasında, sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer alır. Ovaryum, bir korteks ve bir medulladan oluşmaktadır. Medullar bölgesinde gevşek bağ dokusu, nispeten büyük kan damarları, lenf damarları ve sinirler içermektedir. Kortikal bölgesinde ise bağ dokusu içine gömülü ovaryum foliküleri bulunur. Ovaryumlar ovosit üretir (gametogenez). Ovulasyonda sekonder ovosit uterus tüplerinden birine geçer. Bu tüpler (tuba uterina) doğuma kadar embriyo ve fetüsü koruyan ve besleyen uterusa açılır. Ovaryumlar sekonder cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden ve gebeliğin düzenlenmesinden sorumlu hormonlar olan östrojen ve progesteron üretir (steroidogenez).

Ovogenez, ovogonyumların (primordiyal ovositler) primer ovositlere dönüşmesini ifade eder. Olgunlaşma süreci fetal dönemde başlar, ergenlik dönemine kadar tamamlanmaz. Erken fetal yaşam sırasında, ovogonyum mitoz bölünme ile çoğalır ve primer ovositleri oluşturmak üzere büyür.

Doğumda, tüm primer ovositler mayoz bölünmenin birinci evresinin profazını (mitozun ilk aşaması) tamamlamıştır. Ovositler ergenliğe kadar profaz evresinde kalır. Ovulasyondan kısa bir süre önce, primer ovosit ilk mayotik bölünmeyi tamamlar ve sekonder ovosit oluşur.

Sekonder ovosit neredeyse tüm sitoplazmayı alırken, 1.kutup cisimciği çok azını alır ve kısa bir süre sonra dejenere olur. Ovulasyon döneminde (ovositin atılması), sekonder ovosit ikinci mayotik bölünmeye başlar ancak sadece metafaza kadar ilerler. Sekonder ovosit bir sperm tarafından döllenirse, ikinci mayotik bölünme tamamlanıp ikinci kutup cisimciği oluşur. Ovulasyonda atılan sekonder ovositin etrafı ağsı yapıdaki glikoprotein örtü olan zona pellusida ile sarılıdır. Zona pellusidanın dışında foliküler hücrelerden oluşan bir tabaka olan korona radiata ile çevrilidir. Sekonder ovosit büyüktür ve çıplak gözle görülebilir. Yenidoğan

ovaryumlarında 2 milyon kadar primer ovosit bulunur. Bu ovositlerin çoğu çocukluk döneminde geriler ve puberte döneminde 40.000 kadar ovosit kalır. Bu ovositlerin yaklaşık olarak 400 tanesi olgunlaşır ve ovulasyonda atılır. [7].

Primordiyal folikül, tek katlı yassı folikül hücreleri tarafından çevrelenmiş bir ovositten oluşur. Primer folikül, ovositi çevreleyen çok katlı foliküler hücrelerden (granüloza hücreleri) oluşur. Ovosit birkaç tabaka halindeki foliküler hücreler tarafından çevrilip foliküler antrum oluştuğunda sekonder folikül adını alır. Sekonder folikülün boyutu arttıkça, birkaç granüloza hücre tabakası tarafından döşenen antrum genişler ve ovosit ile ilişkili granüloza hücreleri kumulus ooforus denilen ve antruma çıkıntı yapan tümsek oluştururlar. Ovositin etrafını çevreleyen ve ovulasyonda ovositle birlikte kalan kumulus ooforus hücrelerine korona radiata denir. Kumulus ooforus ve korona radiatanın olduğu foliküle olgun Graaf folikül denir. Ovulasyon sonrası geriye kalan granüloza ve teka hücrelerinden meydana gelen folikül duvarı, folikül kollabe olduğunda derin katlantılar yapar ve korpus luteum (sarı cisim) ya da luteal beze dönüşür. İlk olarak teka internadaki kapillerlerden folikülün lümenine doğru olan kanama, merkezi bir pıhtısı bulunan korpus hemorojikumun oluşumuna yol açar. Granüloza ve teka interna tabakalarının hücreleri luteinizasyon denen bir süreç ile granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine farklılaşır. Granüloza lutein hücreleri büyüktür ve granüloza hücrelerinden kaynaklanan merkezi yerleşimli hücrelerdir. Teka lutein hücreleri daha küçük olup teka interna tabakasının hücrelerinden kaynaklanan, daha koyu boyanan, periferik yerleşimli hücrelerdir [8] (Şekil1,Şekil 2, Şekil 3).

4.2. Foliküler Gelişim

- Primer ovositin büyümesi ve farklılaşması
- Foliküler hücrelerin proliferasyonu
- Zona pellusidanın oluşumu
- Folikülü çevreleyen bağ dokusu kapsülünün gelişimi - teka folikülleri [7]

Histolojik olarak primordiyal foliküller, büyümekte olan foliküller (erken primer, geç primer ve sekonder ya da antral) ve olgun (Graaf) foliküller olmak üzere beş temel tip tanımlanır.

1.Primordiyal foliküller: Olgun ovaryumda korteks stromasında tunika albugineanın altında yer alır ve erken gelişimi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Ovositi çevreleyen tek tabaka halinde yassı folikül hücrelerinden oluşur. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi

bazal lamina ile sınırlıdır. Folikül içindeki ovosit yaklaşık 30 µm çapında ve ince dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nükleolus içeren büyük eksantrik bir nükleusa sahiptir. Ovositin ooplazma denilen bir sitoplazması vardır ve Balbiani cisimciği içerir. İnce yapı düzeyinde incelendiğinde Balbiani cisimciği Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazma retikulumunun, birçok mitokondriyonun ve lizozomların birlikte oluşturduğu kümedir. İnsan ovositleri anüler lameller içermektedir ve küçük, küre şeklinde mitokondriyonlarla birlikte çok sayıda küçük vezikül sitoplazmada dağılmış halde bulunur.

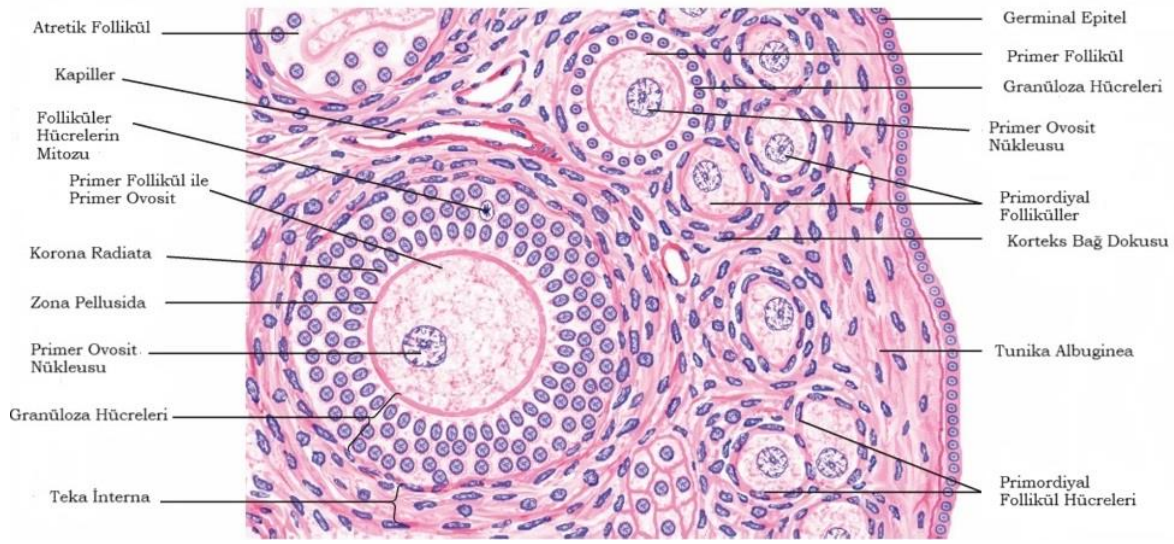
2.Erken Primer Folikül: Primordiyal folikül, büyümekte olan foliküle dönüştüğünde; ovosit, folikül hücreleri ve komşu stromada değişiklikler olur. İlk olarak, ovosit büyür ve ovositi çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik şekil alır. Folikül hücrelerinin kübik olduğu bu evrede, foliküle primer folikül denir. Ovosit büyüdükçe proteinler salgılanır ve bir araya gelen bu proteinler ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluşturur. Zona pellusida, ovosit ve folikül hücreleri arasında ortaya çıkmaktadır. İnsan zona pellusidası, sülfatlı üç asidik zona pellusida (ZP) glikoproteinleri sınıfından meydana gelir ve bu glikoproteinler ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 olarak adlandırılır. Üçü arasında en önemli olanı ZP-3' tür. ZP-3 fonksiyonu, spermatozoa-bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olmaktır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde zona pellusida asidofilik boyalarla ve periyodik asit-Schiff (PAS) reaktifi ile koyu boyanan homojen ve refraktil tabaka olarak görülür. Bu tabaka ovosit tek tabakalı kübik ya da prizmatik folikül hücreleri ile çevrelendiğinde ve çapı 50-80 µm olduğunda ilk olarak görülür.

3.Geç Primer Folikül: Ovositi çevreleyen tek tabakalı folikül hücreleri mitotik proliferasyon ile membrana granülozayı (stratum granülozum) ve ovositi çevreleyen çok katlı epiteli oluşturur. Folikül hücreleri, granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Prizmatik hâle gelen folikül hücrelerinin en dış tabakası ile bağ dokusu yapısındaki stroma arasında bazal lamina yerini korur. Folikülün büyümesi sırasında, granüloza hücreleri arasında yaygın oluklu bağlantılar oluşur. Granüloza hücrelerinin bazal tabakasında karmaşık sıkı bağlantılar (zonula okludensler) bulunmaz. Bu durum kan-folikül bariyeri bulunmadığını göstermektedir. Bağ dokusu hücreleri primer folikülün teka tabakalarını oluşturur. Granüloza hücreleri proliferasyona uğrayınca folikül çevresindeki stromal hücreler, bazal lamina dışında teka folikülü denilen bağ dokusu hücreleri kılıfı oluşturur. Teka folikülü iki tabakaya farklılaşır. Teka interna, kübik salgı hücrelerinden oluşan ve yüksek düzeyde vaskülarize olan iç tabakadır. Teka internanın hücrelerinde çok sayıda luteinizan hormon (LH) reseptörleri bulunur. Teka eksterna, düz kas hücreleri ve kollajen fibril demetleri içeren dış bağ dokusu hücreleri tabakasıdır. Ovosit maturasyonu primer folikülde gerçekleşir. Ovositten perivitellin aralığa doğru düzensiz çok

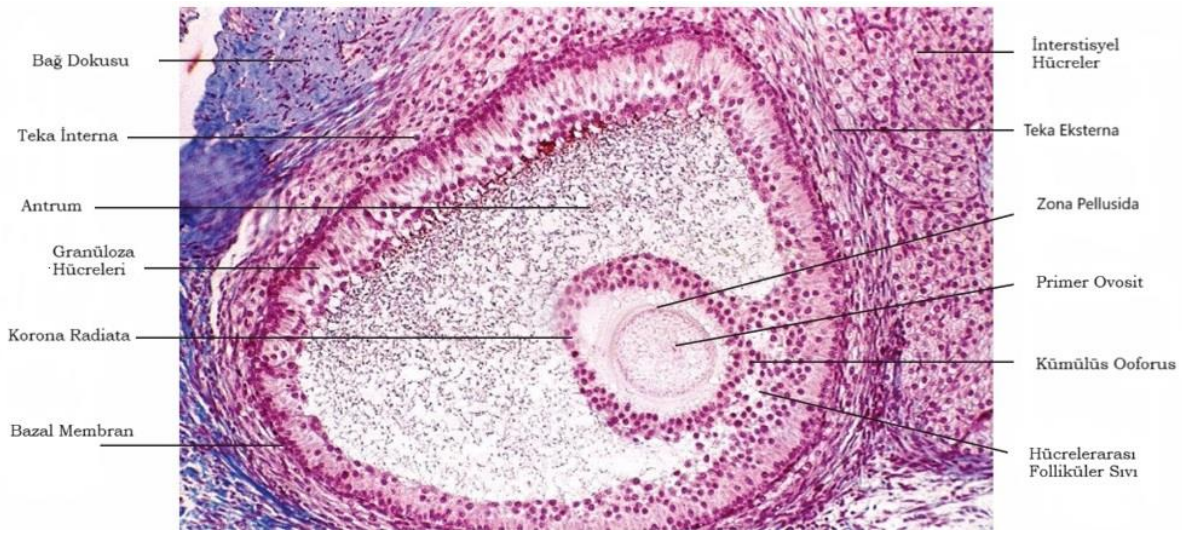
sayıda mikrovillus uzanır. Perivitellin aralık, ovosit hücre membranı ile zona pellusida arasında bulunur.

4.Sekonder Folikül: Stratum granülozum 6-12 hücre tabakası kalınlığına eriştiğinde, granüloza hücrelerinin arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar. Granüloza hücreleri arasında likör folikül denen sıvı biriktikçe kaviteler birleşir ve antrum denilen hilal biçimli tek bir kavite oluşur. Folikül artık sekonder folikül ya da antral foliküldür. Eksantrik yerleşimli ovosit daha fazla büyümez. Granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgılanan peptid ovosit maturasyon inhibitörü (OMI), büyümenin inhibisyonunu sağlar. Ovosit ile ilişkili olduğu bölgede granüloza hücreleri kumulus ooforus denilen antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluşturur. Ovositin etrafını çevreleyen ve ovulasyonda ovositle birlikte kalan kumulus ooforus hücreleri korona radiata adını alır. Granüloza hücrelerinin arasında koyu boyanan, PAS pozitif Call-Exner cisimcikleri olarak isimlendirilen ekstraselüler materyal bu evrede ortaya çıkar.

5.Olgun Folikül (Graaf folikülü): Folikül boyutu yaklaşık 10 mm ya da daha fazla olur ve ovaryumun yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Antrum boyutu artar ve stratum granülozum tabakası incelir. Teka tabakaları daha belirgin hale gelir ve teka interna hücrelerinin sitoplazmalarında lipit damlacıkları ortaya çıkar [8].



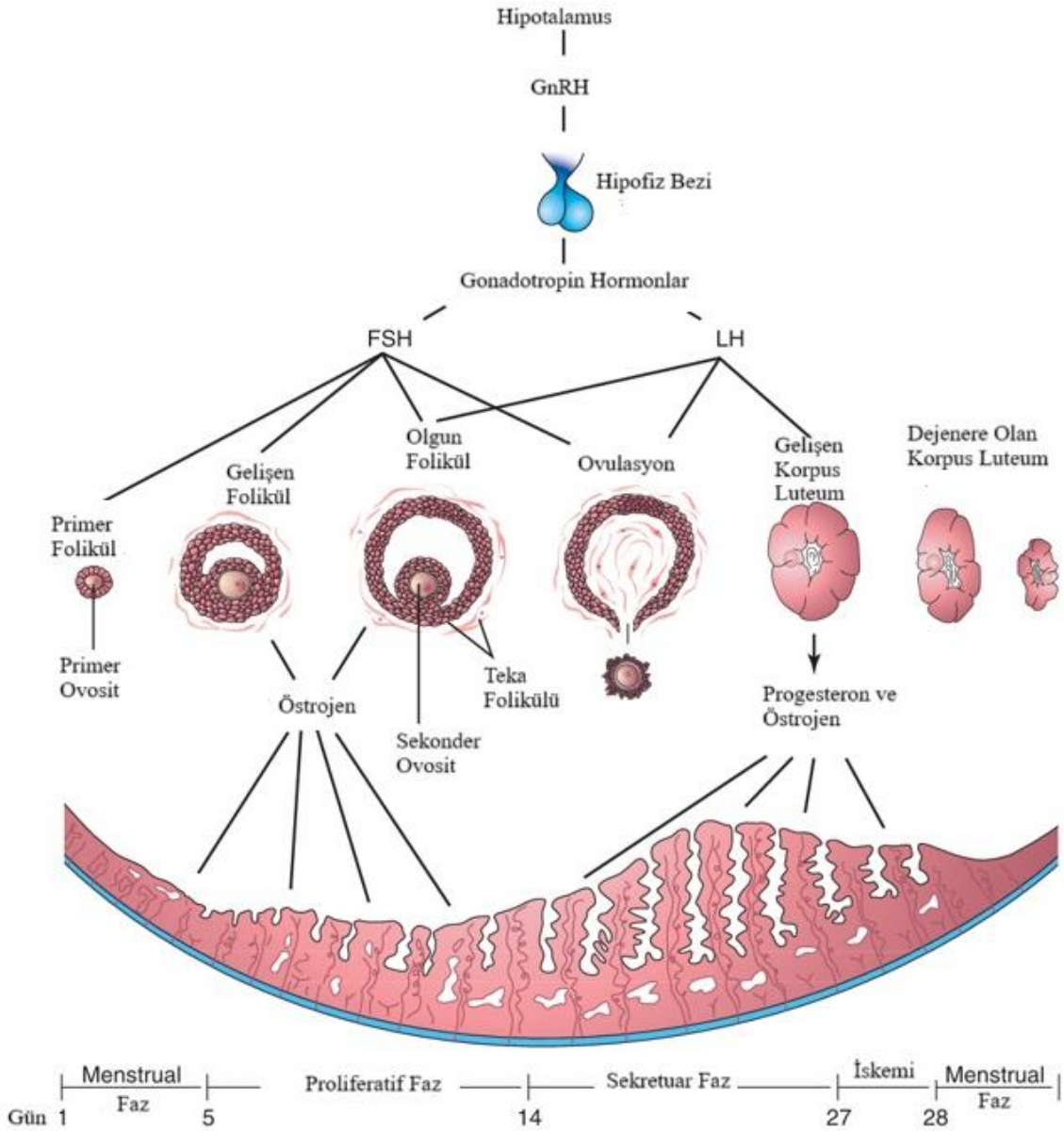
Şekil 1. Ovaryum dokusunun korteksine ait şematik çizimde farklı gelişim aşamalarında primer ve primordiyal foliküller izlenmektedir [9].



Şekil 2. Ovaryum dokusuna ait kesitte Graaf folikülü izlenmektedir - Mallory Azan Boyası [9]

4.3. Ovulasyon

Menarşta (ilk menstrüel dönem), dişiler hipotalamus, hipofiz bezi ve ovaryum tarafından düzenlenen aylık üreme döngülerine girerler. Hipotalamus nörosekretuar hücreleri tarafından salınan gonadotropin, hipofiz bezinin anterior bölgesinden folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) salınımına yol açar. FSH; foliküler hücreleri uyararak östrojen üretilmesini sağlar. LH; ovulasyon indükleyici olarak rol alır ve korpus luteumu progesteron üretimi için uyarır. FSH ve LH endometriyum gelişiminde de rol alır (Şekil 3) [7].

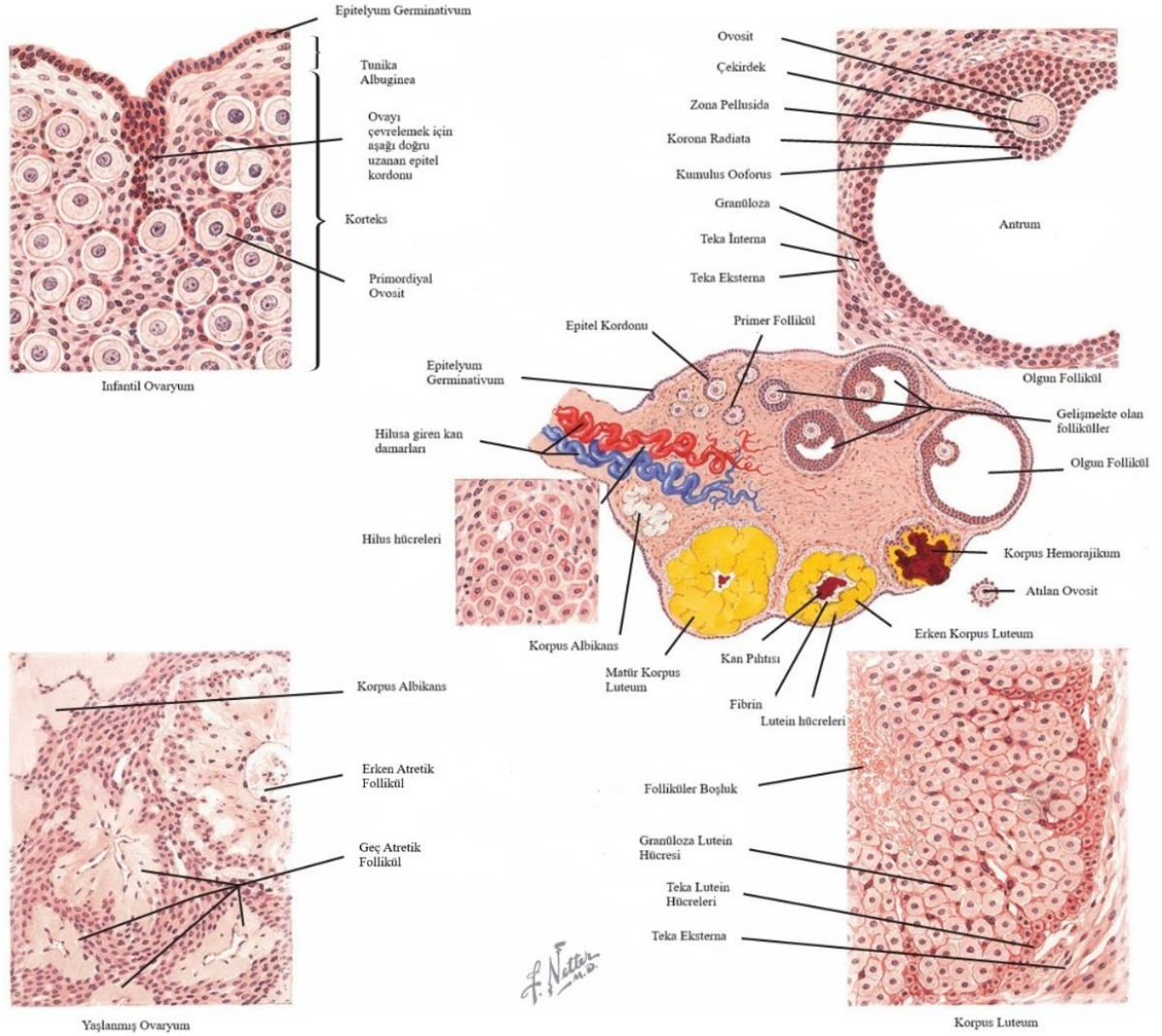


Şekil 3. Menstrüel siklusta hipotalamus, hipofiz bezi, ovaryum ve endometrium arasındaki ilişkinin gösterimi [7] .

Ovulasyon, sekonder ovositin Graaf folikülünden atıldığı dönemdir. Menstrüel siklusta ovulasyona uğrayacak olan folikül, siklusun ilk günlerinde birkaç primer ovositten oluşan bir grup içinden seçilir. Ovulasyondan önce folikül çıkıntısı üzerinde ovaryan yüzeyin küçük bir alanında kan akımı durur. Germinal epitelin foliküler stigma olarak bilinen bu bölümü yükselir ve rüptüre olur. Korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri tarafından çevrelenmiş ovosit, folikülden atılır. Kumulus kütlesi fimbriyalar tarafından tuba uterinanın abdominal ostiumuna doğru süpürülür.

Primordiyal foliküllerin içindeki primer ovositler birinci mayotik bölünmeye embriyoda başlar ve mayotik profazın diploten evresinde arreste uğrar. Birinci mayotik profaz ovulasyondan hemen öncesine kadar tamamlanmaz. Olgun folikülde birinci mayotik bölünme

tamamlandığında sekonder ovosit oluşur. Sekonder ovosit, ovulasyondan önce ikinci mayotik bölünmenin metafazında arreste uğrar. Fertilizasyon gerçekleşirse sekonder ovosit ikinci mayotik bölünmeyi tamamlar. Ovulasyon sonrası geride kalan granüloza ve teka hücrelerinden oluşan folikül duvarı korpus luteuma dönüşür. Teka internada yer alan kapillerden folikül lümenine doğru olan kanama, korpus hemorojikumun oluşumuna yol açar. Luteinizasyon denen süreç ile granüloza ve teka interna tabakalarının hücreleri granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine farklılaşır. Korpus luteum ovaryum korteksinde yer alır ve progesteron-östrojen salgılar. Fertilizasyon gerçekleşmezse 14 gün aktif olan korpus luteum dejenere olur. Dejenere hücrelerin içinde hiyalin materyal birikimi ile korpus albikans oluşur. Folikül atrezisi, ovaryumda embriyonik dönemde başlar ve düzenli bir şekilde gerçekleşir. Atrezide ilk görülen değişiklikler, foliküler hücrelerin nükleuslarında piknotik görünüm ve sitoplazmada dejenerasyon bulgularıdır. Belirgin zona pellusida ve dejenere ovosit görülür [8](Şekil 4).



Şekil 4. Ovaryum siklusunun şematik gösterimi [10].

4.4. Ovaryum Embriyolojisi

Gonadlar (testis ve ovaryum) karın arka duvarını örten mezodermal epitel, altta uzanan mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordiyal germ hücrelerinden oluşur. Gonadal gelişim, beşinci hafta sırasında mezonefrozun medial tarafından kalınlaşmış bir mezotel alanının gelişmesiyle başlar. Bu epitelin ve altta uzanan mezenşimin proliferasyonu, mezonefrozun medial tarafında, gonadal kabartı denilen çıkıntıyı oluşturur. Parmak benzeri epitel kordonları (gonadal kordonlar) kısa bir süre sonra altta uzanan mezenşim içine doğru büyür. Bu aşamada farklanmamış gonadlar artık dış korteks ve iç medulladan oluşmaktadır. XX seks kromozomuna sahip embriyolarda, gonadın korteksi ovaryuma farklanır ve medulla geriler (Şekil 5).

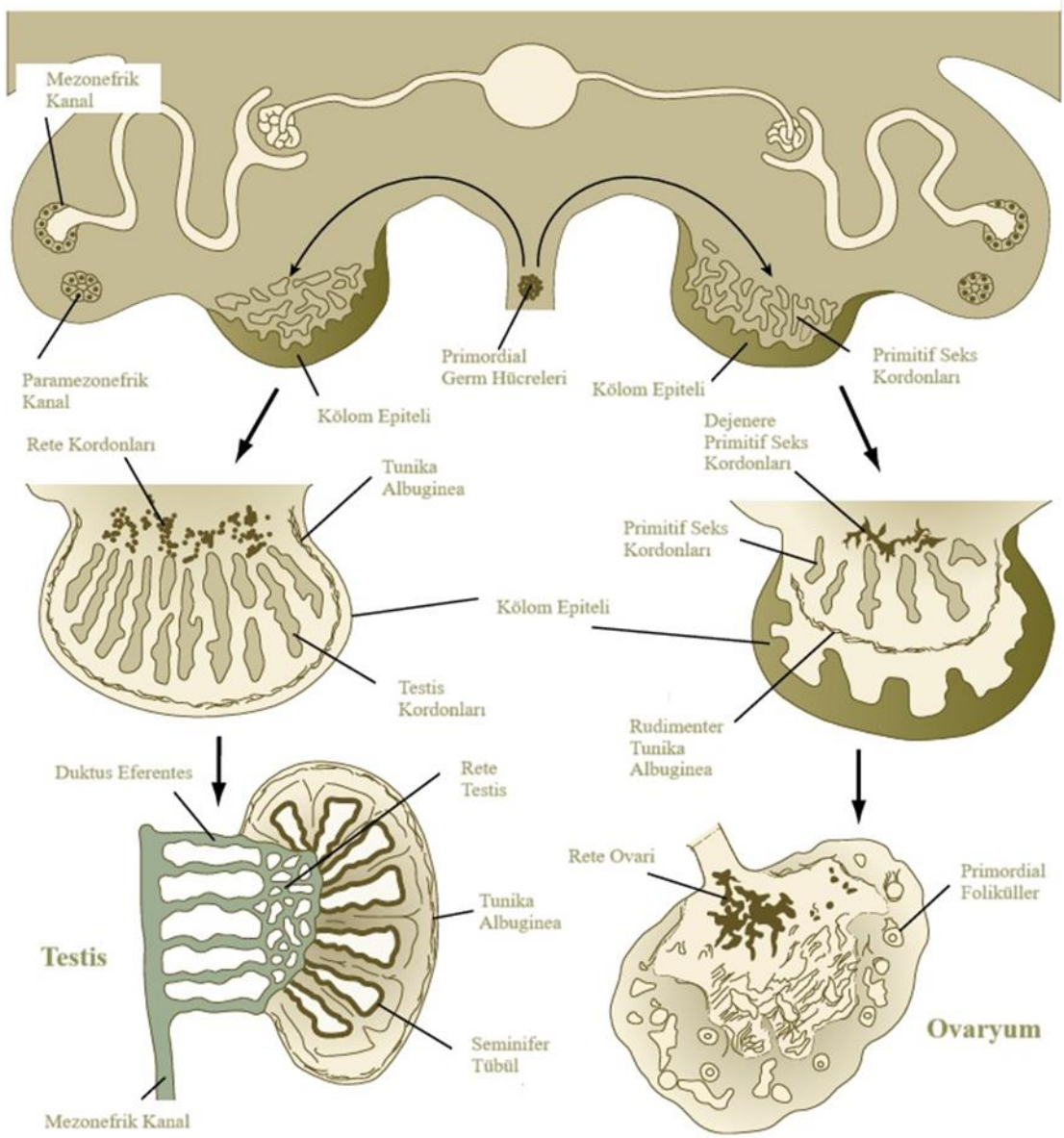
Primordiyal germ hücreleri, vitellüs kesesinin duvarından kaynaklanır ve bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara doğru göç ederler. Altıncı haftada, primordiyal germ hücreleri altta uzanan mezenşime girer ve gonadal kordonlara katılırlar. Bunlar sonunda ovositlere farklanır.

Gonadal kordonlar medulla içine uzanır ve rudimenter rete ovariyi oluşturur. Bu yapı normal olarak dejenere olur ve kaybolur. Kortikal kordonlar, erken fetal dönem süresince, gelişen ovaryumun yüzey epitelinden alta uzanan mezenşime doğru uzar. Kortikal kordonlar büyüdükçe, primordiyal germ hücreleri bunlara katılır. Yaklaşık olarak 16. haftada, bu kortikal kordonlar, her biri kortikal kordondan gelişen tek bir tabaka foliküler hücreler ile sarılmış bir ovogonyum içeren, primordiyal foliküller adı verilen izole hücre kümelerine ayrılırlar. Fetal yaşam boyunca aktif mitozla, binlerce ovogonyum üretilir.

Postnatal olarak hiç ovogonyum oluşmaz. Ovogonyumların çoğu doğum öncesi dejenere olur, 2 milyon kadar ovogonyum doğum öncesi primer ovositleri oluşturmak üzere büyür. Doğumdan sonra ovaryumun yüzey epiteli ovaryumun hilusunda peritonun mezoteli ile devam eden tek bir hücre tabakasına yassılaşır. Yüzey epiteli kortekste, ince, fibröz bir kapsül olan tunika albuginea ile foliküllerden ayrılır. Ovaryum gerileyen mezonefrozdan ayrılırken, kendi mezenteri olan mezovaryum ile asılı kalır.

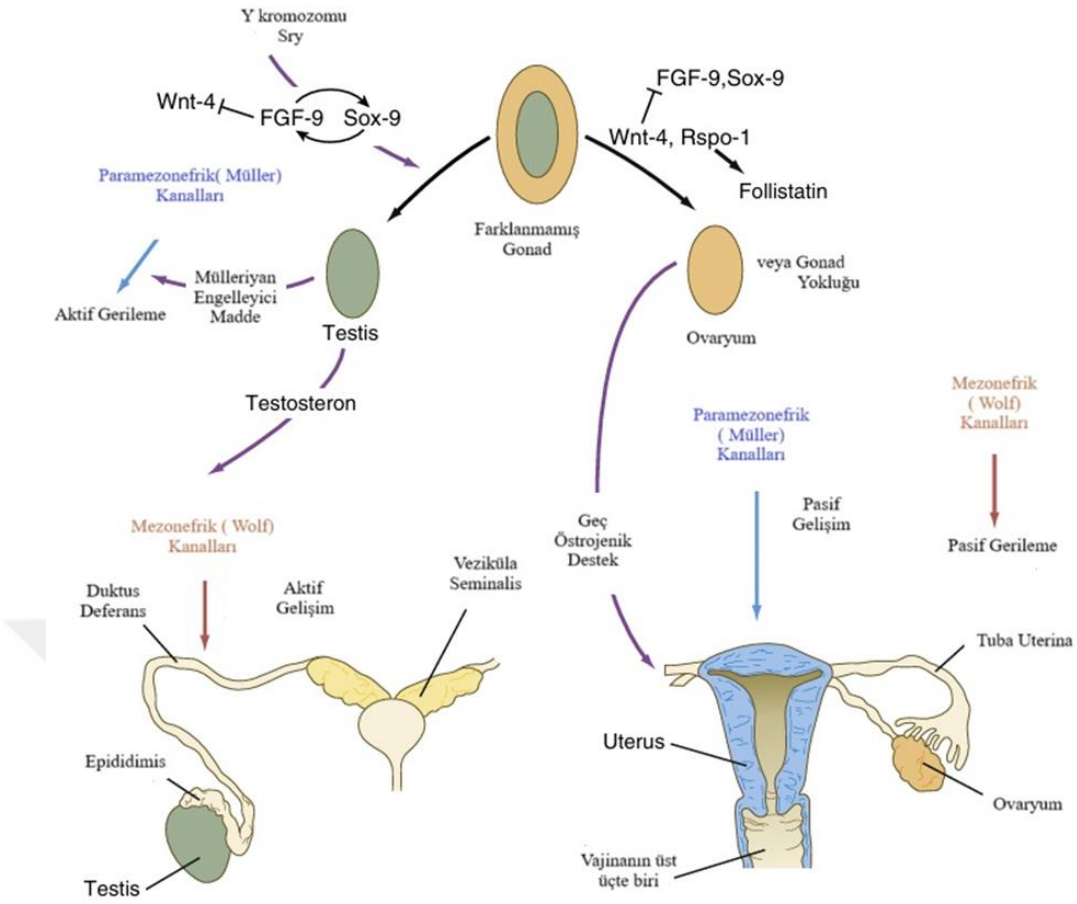
Ovaryumlar üst karın duvarından pelvise, pelvisin üst kenarının hemen altına doğru iner. Gubernakulum, uterin tübün bağlandığı yere yakın bir yerden uterusa bağlanır. Gubernakulumun kraniyal kısmı ovaryum ligamenti, kaudal kısmı ise uterusun round

ligamentini oluşturur. Round ligament, inguinal kanallardan geçer ve labia majörde son bulur [7].



Şekil 5. Gonadal farklanmanın morfolojisi [11].

Östrojen varlığında, testesteron ve AMH (Anti-Müllerian Hormon) yokluğunda ovaryum paramezonefrik kanallardan ana genital kanala dönüşür. Kaynaşan paramezonefrik (Müllerian) kanallar östrojen etkisiyle uterusun korpus ve serviksini; vajen üst kısmını oluşturur. WNT 4, ovaryum belirleyici gen olarak tanımlanır. WNT 4, nükleer hormon reseptör ailesinden olan DAX 1'i uyarır, DAX 1' de testis gelişiminde rol alan SOX 9 genini baskılar (Şekil 6) [12].

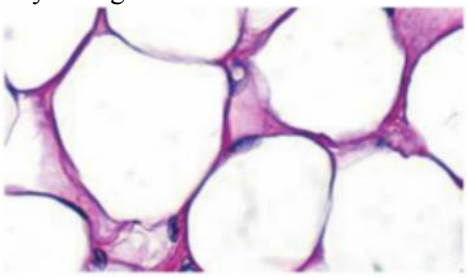


Şekil 6. Genital sistemin farklılaşmasında yer alan faktörler [11].

4.5. Beyaz Yağ Dokusu Histolojisi

Beyaz yağ dokusu hücreleri (adipositler) lipitleri tek, büyük bir damlacık halinde depolar. Yağ hücrelerinde depolanan lipitler esas olarak bağırsak lipoproteinlerinden ve karaciğerden gelen çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerden türetilen trigliseritlerdir (yağ asitleri ve gliserol). Beyaz yağ dokusu vücudun her yerine dağılmıştır ve dağılımı büyük ölçüde bireyin cinsiyetine ve yaşına bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Beyaz yağ dokusu, önemli bir enerji kaynağı olmasının yanı sıra, cilt altında yalıtım sağlar ve farklı organların çevresinde tamponlayıcı yağ yastıkçıkları oluşturur. Bu doku aynı zamanda yüksek metabolik aktivitesinin bir sonucu olarak oldukça vaskülarizedir. Beyaz yağ hücrelerinde ayrıca insülin, glukokortikoidler, büyüme hormonu için reseptörler bulunur. Bunun sonucunda yağ dokusu lipid biriktirip gerektiğinde de lipit salınımını sağlar. Beyaz yağ dokusu önemli bir endokrin organ olarak görev yapar. Adipositler, hücrelerde karbonhidrat ve lipid metabolizmasını artıran leptin adlı hormonun tek kaynağıdır. Bu hormon aynı zamanda hipotalamusta iştahı ve besin alımını engelleyen veya baskılayan hücreleri de etkiler (Tablo 1) [9].

Tablo 1. Beyaz Yağ Dokusunun Özellikleri [8].

ÖZELLİKLER	Beyaz Yağ Dokusu 
YER	Deri altı tabaka, meme bezi, büyük omentum, mezenterler, Retroperitoneal boşluk, visseral perikard, orbita
FONKSİYON	Metabolik enerji depolama, yalıtım, hormon üretimi
ADİPOSİT MORFOLOJİSİ	Uniloküler, küresel, düzleşmiş çekirdek, Büyük çap (15-150 μm)
ÖNCÜ HÜCRELER	Perivasküler mezenkimal kök hücreler
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ DİFERANSİYASYON	PPAR Ɣ/RXR
UCP-1 GENE EKSPRESYON	Hayır
MİTOKONDRİYON	Az miktarda, ipliksi uzamış gelişimi az krista
İNNERVASYON	Birkaç sempatik sinir lifi
VASKÜLARİZASYON	Birkaç kan damarı
ÇEVRESEL STRESE CEVAP (örneğin SOĞUK MARUZİYETİ)	Azalmış lipogenez Artan lipoprotein lipaz aktivitesi Kahverengi yağ dokusuna farklılaşma
BÜYÜME VE FARKLILAŞMA	Tüm yaşam boyunca stromal perivasküler hücrelerden kahverengi yağ dokusuna farklılaşma geçirebilir

4.6. Yağ Dokusu Embriyolojisi

Adipositler, mezenkimal kök hücrelerden PPAR Ɣ/RXR transkripsiyon faktörlerini eksprese ederek erken lipoblasta (preadiposit) dönüşürler. Lipoblastlar bir eksternal (bazal) lamina geliştirirler ve sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacığı biriktirmeye başlarlar. Beyaz adipoz dokuda bu damlacıklar tek bir büyük lipid damlacığı oluşturmak üzere birleşirler. Bu lipid damlacık sonunda matür hücreyi doldurur ve çekirdek, sitoplazma ve organeller damlacık çevresinde ince bir halka oluşturur [8].

Adipositlerin zigottan başlayarak geçirmiş olduğu farklılaşma yolu pluripotent kök hücrelerle başlayıp uniloküler olgun adiposit aşamasında sona erer. Bu süreçte MKH (Mezenkimal Kök Hücre)' nin in vivo karşılığı olan hücrelerin bir bölümü iç ve dış sinyallerin etkisiyle adipojenik yola girer. Bu aşama hücrenin kararlanma sürecidir ve hücre bölünmesinin G_1 aşamasında farklılaşma ile ilgili transkripsiyon faktörleri hücrede özgün fenotipin kazanılmasını ve adiposite özgü lipid ve glikoz metabolizmasının çalışmasını başlatır. Lipid

granüllerinin sentezi artarak sürer, buna koşut olarak hücre hacimce büyür (hipertrofi) ve yuvarlaklaşır. Son aşamada multiloküler yerleşimli olan lipid tanecikleri birleşerek tek bir lipid taneciği (uniloküler) haline gelir. Bu, hücrenin farklılaşmada ulaştığı son aşamadır. Vücudun birçok bölgesinde bulunan yağ dokusundaki adipositler bu biçimleriyle uzun süren yaşamlarını sürdürürken, dermisteki yağ bezleri içinde bulunan adipositler apopitoza uğrar ve holokrin salgı mekanizmasıyla vücut dışına salgılanır [13].

4.7. Speksin (SPX)

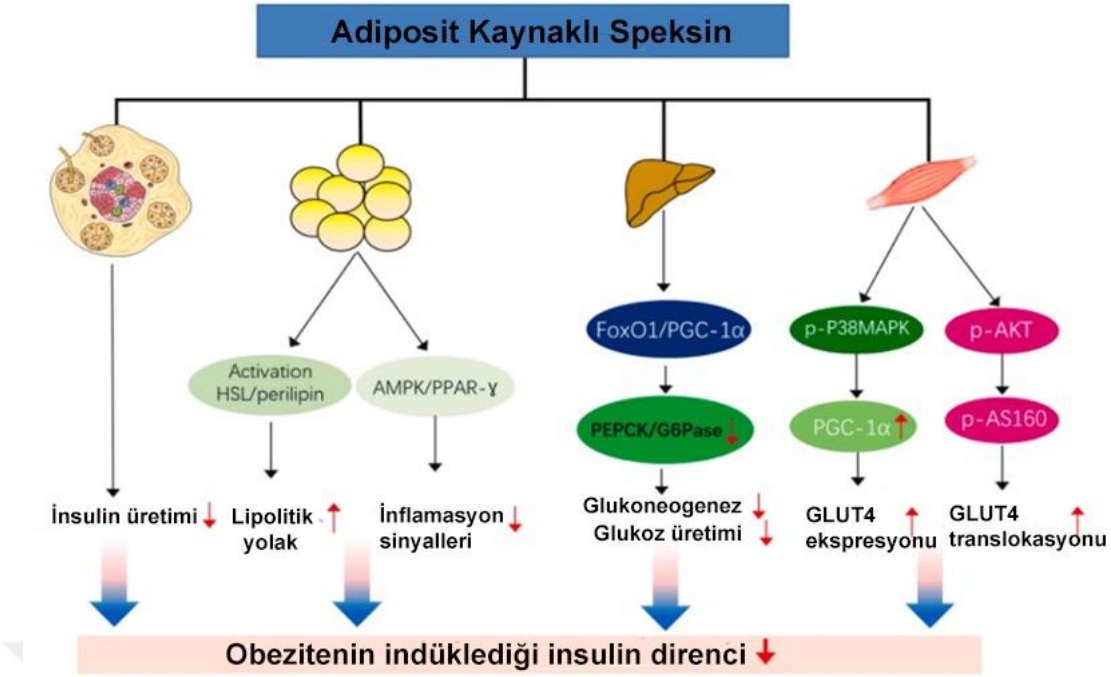
Spexin (SPX), nöropeptid Q (NPQ) olarak da isimlendirilmektedir. Bir peptid hormon olan SPX, ilk olarak insan genomunda Markov modeline dayanan biyoinformatik yöntemle tanımlanmıştır. SPX biyokimyasal yöntemle doğrulanıp, ilk kez farelerin özofagusu ve midesinde tespit edilmiştir [14].

İnsanlarda SPX mRNA ve sitoplazmik immun ifadesi deride, akciğerde, midede, ince bağırsakta, kolonda, karaciğerde, pankreas adacıklarında, tiroitte, adrenal bezde, visseral yağ dokusunda, böbreklerde gösterilmiştir [15].

Sıçanlarda beyin, hipotalamus, yemek borusu, karaciğer, böbrek, tiroid ve ovaryumda SPX mRNA'sı tespit edilmiştir [16].

Sağlıklı yetişkin kadınlarda serum SPX düzeyinin yaş, BMI (Vücut Kitle İndeksi), açlık glikozu ve trigliserid ile negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir [17].

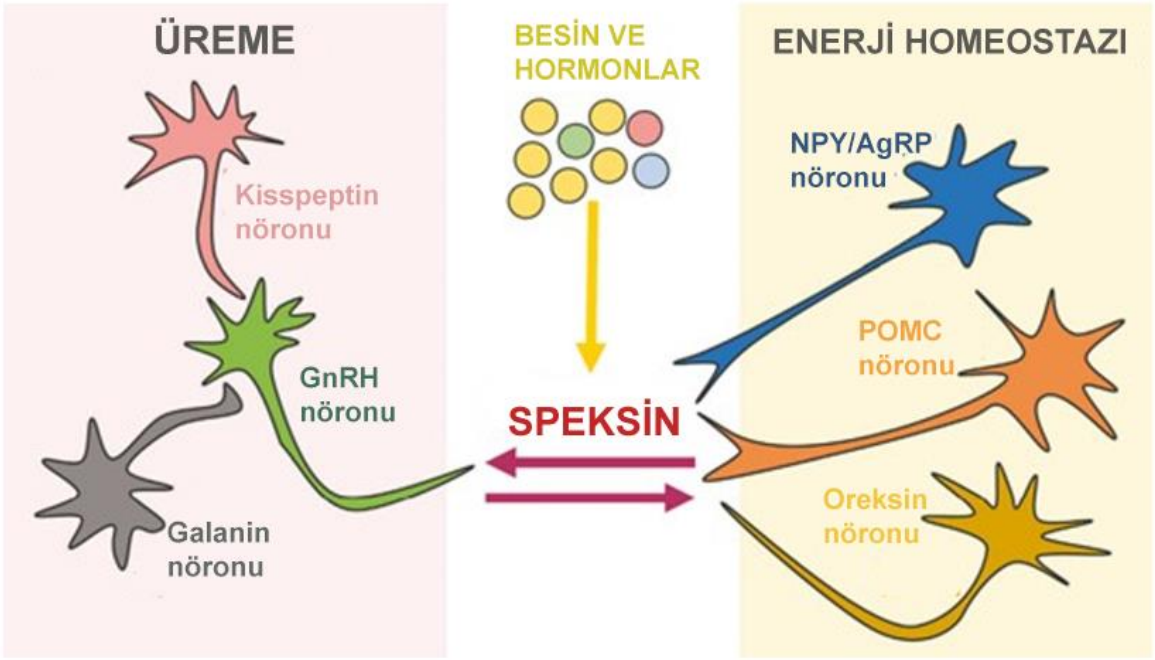
Obezitede yağ dokusunun endokrin bozukluğu insülin direncinin gelişmesinde kritik rol oynar. SPX, obezitenin neden olduğu insülin direnci ve T2DM'nin patofizyolojisinde önemli role sahiptir. Özellikle dolaşımdaki adiposit türevli adiponektin, kemerin (chemerin), galanin ve speksin, karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusundaki lipid ve glikoz metabolizmasını düzenlemedeki potansiyel metabolik rolleri nedeniyle dikkat çekmektedir [18-20]. SPX yağ dokusu seviyelerinin dolaşımdaki seviyeleri ile ilişkili olduğu görülmektedir, bu da insüline duyarlı dokularda lipid ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde kapsamlı bir endokrin role işaret etmektedir. Metabolik bozukluklar (örneğin, obezite ve inflamasyon) devam ettiğinde, yağ dokusunda SPX ekspresyonu azalır, yağ dokusunu ve iskelet kasını insülin direncine duyarlı hâle getirir. Fiziksel aktivitenin insülin direncini hafifletmesi için SPX gereklidir (Şekil7) [4].



Şekil 7. Adiposit kaynaklı SPX, insülin sekresyonunu, düşük dereceli inflamasyonu ve insülin direncini hafifletmek için lipogenezi azaltır, GLUT4 ekspresyonunu ve translokasyonunu teşvik ederek iskelet kasında lipolizi, glikoz alımını ve insülin duyarlılığını arttırır [4].

SPX, enerji homeostazında yer alan NPY/AgRP, POMC ve Orexin nöronlarının modülasyonu yoluyla GnRH'yi dolaylı olarak düzenleyebilir. NPY, AgRP, CART ve α MSH, dişi farelerin hipotalamusundaki GnRH salgılanmasını modüle ederken [5] speksin ise hedef hücreler üzerindeki GnRH etkisini modüle eder (Şekil 8). Örneğin, GnRH nöronları, hipofizden LH salgılanmasını artırmak için GnRH ile sinerjistik olarak hareket eden GAL salgılar [21-23]. Bir balık türü olan teleostlarda yapılan çalışmalara göre fonksiyonel SPX salgılanması durumunda, GnRH'nin LH ve FSH salgılanması üzerindeki uyarıcı etkisi baskılanır [23, 24]. Günümüzde fonksiyonel speksinin doğal GnRH nöronlarında eksprese edilip edilmediği veya bunlardan salgılanıp salgılanmadığı bilinmemektedir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar, speksinin çoklu düzeyde üreme işlevindeki rolü için güçlü kanıtlar sunmaktadır [6]. Nöropeptitler, HPA (Hipotalamo-pituiter-adrenal) eksen düzenleyicileri olarak HPG (Hipotalamo-pituiter-gonadal) eksen işlevini hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Kisspeptin, Relaxin-3, Nesfatin-1, Phoenixin ve Speksinin endokrin ve sinir sistemleri arasındaki bağlantısal işlevi tam olarak tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, birkaç klinik çalışma bu nöropeptitlerin HPA ve HPG ekseninin düzenlenmesindeki potansiyel rolü konusunda daha fazla çalışmaya gereksinim olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda beslenme davranışında da önemli rol oynayan bu nöropeptidlerin metabolik bozukluklarda üremeyi baskılayıcı etkileri üzerinde durulmaktadır [23]. Akvaryum balıklarında gonadektomi, hipotalamusta SPX ekspresyonunun yükselmesine

neden olmuştur. SPX uygulaması ayrıca kan LH konsantrasyonlarında bir azalmaya neden olmuştur [21]. Klinik çalışmalarda, Polikistik Over Sendrom'lu hastalarda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında daha düşük kan speksin konsantrasyonları gözlemlenmiştir [21].



Şekil 8. İştahı düzenleyen NPY/AgRP ve POMC nöronlarının yanı sıra GnRH nöronları,besin ve enerji durumunun periferik sinyallerinden etkilenir. GnRH, yukarı akışlı kisspeptin ve GAL nöronları tarafından da düzenlenir. NPY/AgRP, POMC ve oreksin nöronları enerji homeostazında yer alır ve bu besleme devresinden gelen çıktılar, üremeyi modüle etmek için GnRH nöronlarını besleyebilir. Ayrıca, peptit SPX, enerji homeostazının ve üremenin birbirine bağlı koordinasyonunda yer alır. Periferik SPX, beslenmeyi indüklemek veya bastırmak için NPY/AgRP ve/veya POMC nöronlarını modüle edebilir ve bu besleme devresinden gelen uyarılar, üremeyi modüle etmek için GnRH nöronlarını stimüle edebilir. SPX, üreme ve enerji homeostazını kontrol etmek için bu hipotalamik nöronları doğrudan veya dolaylı olarak modüle edebilir [6].

4.8. İnsanda Ergenlik Dönemi

Puberte, cinsel olgunlaşmanın belirtilerinden fiziksel, zihinsel ve duygusal olgunluğa ulaşmaya kadar uzanan fizyolojik bir dönemdir. Kızlarda puberte değişiklikleri, doğrudan veya dolaylı olarak hipotalamus-hipofiz- ovaryum aksının düzenlenmesi ile ortaya çıkar. İnsanda ergenlik, yeni sirkadiyen gonadotropin ritimlerinin oluşturulması ve kadınlarda menstrüel döngüde pozitif östrojen geri besleme döngüsünün kazanılmasıyla karakterize edilir. Kızlarda ergenlik dönemi genellikle 7-14 yaşları arasında görülür. Ergenlik başlangıç yaşı ve ilerleme hızı; genetik, sosyoekonomik, beslenme, fiziksel ve psikolojik faktörlere bağlıdır.

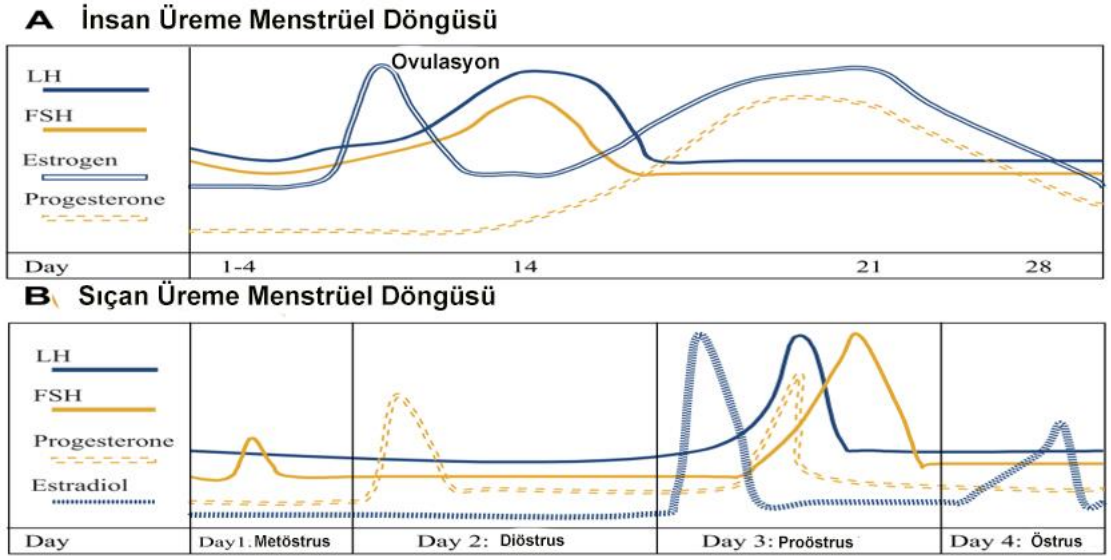
Ovaryum seks steroidleri, büyüme hormonu ve adrenal androjenlerle birleşerek ergenlik döneminde büyüme atağında görev alır. Kemiklerin normal oluşumu, mineralizasyonu ve olgunlaşması için östrojen gereklidir. Ergenlik dönemi yaklaştıkça hipofiz gonadotropinlerinin salgısının artmasına, seks steroidi çıkışının uyarılmasına ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesine yol açar. Hem LH hem de FSH'nun artması başlangıçta geceleri uykuda meydana gelir ve ertesi sabah artan östrodiol salgılanmasıyla ilişkilidir. LH ve FSH aralıklı olarak salgılanır. Ergenliğin ilerleyen dönemlerinde LH ve FSH salgısı, gece artışlarının hâlâ devam ettiği erken foliküler faz dışında 24 saatlik süre boyunca artar. Ovaryum tarafından salgılanan östrodiolün (E_2) bazal seviyeleri ergenlik boyunca artış gösterir. Pozitif östrojen geri bildirimi ve ovulasyon için "kritik vücut kütlesi" gerekebilir. Menarştan sonraki ilk 2 yıl boyunca, hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninin senkronizasyonundaki gecikme nedeniyle menstrüel siklusların %90'a kadarı anovulatuvar gözlenebilir [25].

Pubertenin erken başlamasında etkili olduğu öne sürülenfaktörler içinde fazla kilo, obezite ve azalmış aktivitenin ilk sıralarda yer aldığı düşünülmektedir. Obezite puberte başlangıcını etkileyen en önemli faktördür. Kız çocuklarında çocukluk çağı obezitesi ile erken puberte arasındaki ilişki, obezite ile ilişkili insülin direnci/hiperinsülinemi ile açıklanmıştır. Özellikle artan insülin seviyeleri, adrenal bezler, karaciğer, ovaryum ve yağ hücrelerine etki ederek seks steroid üretimini uyarabilir. Obezite ve ergenlik arasındaki ilişkiyi açıklayan bir diğer önemli faktör gonadotropin sekresyonu üzerinde doğrudan etki gösterebilen leptindir [26]. Puberte döneminde fizyolojik insülin duyarlılığında azalma GH, IGF1, leptin ve kisspeptin düzeylerinde artış görülmektedir. HPA eksen aktivitesinin düzenleyicileri olan nöropeptitler, hipotalamus nöronlarından gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılanmasını düzenleyerek HPG ekseninin işlevini de etkiler. SPX gibi iştah düzenleyici hormonların da GnRH salgılanmasını etkileyebileceği belirtilmektedir [27, 28]. Leptin ve insülin GnRH üzerinde uyarıcı etkiler gösterirken, ghrelin hipotalamustaki GnRH hücreleri üzerinde inhibitör etkilere sahiptir [29].

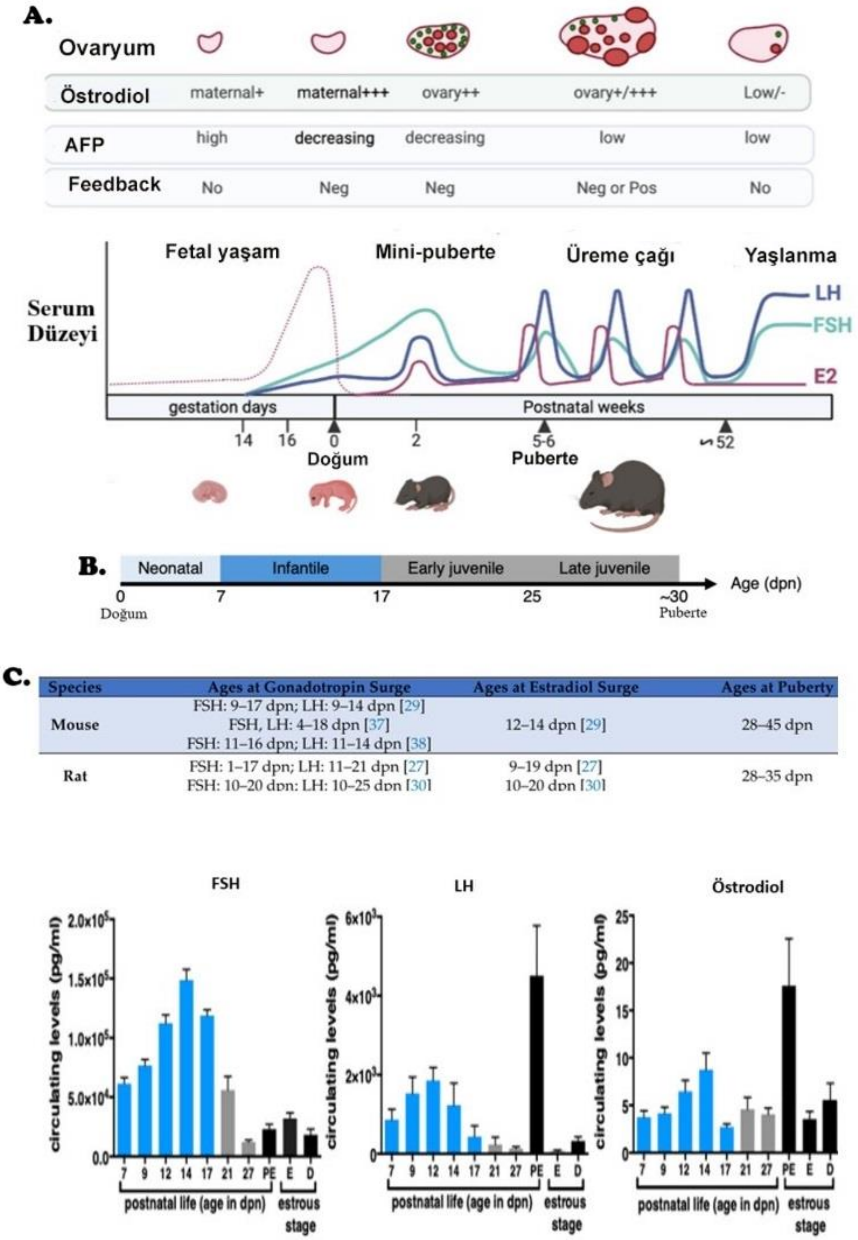
4.9. Sıçanda Ergenlik Dönemi

Östrus döngüsü kemirgenlerdeki üreme döngüsünü ifade eder. İnsan üreme döngüsüne benzerdir ve yaygın olarak menstrüel döngü olarak adlandırılır. Östrus döngüsünün proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere dört aşaması vardır ve 4- 5 gün sürer. Farelerin üreme dönemi ve östrus döngüsü, vajinanın açılmasıyla doğumdan yaklaşık 26 gün sonra başlar ve bu vajinal kornifikasyondan yaklaşık 10 gün öncedir. Apoptozis aracılı vajinal açıklık, farelerde

pubertenin bir ön habercisi olarak kullanılan temel bir parametredir. Vajinal açılma, östradiol konsantrasyonunda bir artışla ilişkilidir. Sıçanlarda, ilk ovulasyon sırasında vajinal bir açıklık meydana gelir. Dişi sıçanlarda puberte, doğum sonrası 4. haftadan sonra, yaklaşık 30 günlükken, luteinize hormonun (LH) pulsatil salgılanmasıyla başlar. Bu dönem anöstrustur ve ilk proöstrustan yaklaşık 8 ila 9 gün önce gerçekleşir. İlk proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus daha sonra gelir. Metöstrus yalnızca gebe kalınmadığında gerçekleşir. Proestrus fazı, dolaşımdaki E_2 konsantrasyonlarında artış ve prolaktinde küçük bir artışla ilişkili olan insan foliküler aşamasına karşılık gelir, bu LH ve Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) salınımında artışa yol açar. FSH konsantrasyonundaki zirve, estradiol (E_2) seviyelerinde ilişkili hızlı bir düşüşle ovulasyon ve östrus fazıyla ilişkilidir. Metöstrus ve diöstrus, sırasıyla yüksek progesteron seviyeleriyle üreme döngüsünün insan erken ve geç salgılama aşamalarına homologdur (Şekil 9 ve 10) [30].



Şekil 9. A**.** İnsan üreme menstrüel döngüsü 28 gün sürer ve ovulasyon 14. günde gerçekleşir. Vajinal kanamanın ilk günü 1. gündür. Döngünün ilk aşaması, E_2 ve progesteron seviyelerinin çok düşük olduğu foliküler fazdır. Yaklaşık 12. günde, E_2 seviyeleri yükselir ve hipofiz LH ve FSH salgılanmasının artmasına neden olur, seviyeler 14. günde zirve yapar. Bu LH/FSH dalgalanması ovulasyon, ovaryum E_2'ün sürekli yükselmesi ve progesteron seviyelerinde yeni bir artışla sonuçlanır. Luteal faz olarak adlandırılan ovulasyon sonrası dönemde östrojen ve progesteron seviyeleri önce yükselir, ardından çok düşük seviyelere geriler ve bu noktada bir sonraki menstrüel dönem başlar. B. Sıçan üreme döngüsü insan döngüsünden çok daha kısadır ve 4 ila 5 günden oluşur. Progesteron, 2. günde postovulasyon fazının (yani diöstrus*) başlarında keskin bir şekilde artar ve 2. günde geç diöstrusta keskin bir şekilde düşer. Foliküler fazın (yani proöstrus**) başladığı yaklaşık öğlen saatlerinde östrojen seviyeleri belirgin bir şekilde yükselir ve proöstrusun yaklaşık 4'ü ile 6'sı arasında LH ve FSH'nin hızlı bir şekilde zirve yapmasına ve progesteron salgısının artmasına neden olur. İnsanlarda olduğu gibi, gonadotropin dalgalanması ovulasyonu tetikler. Tüm bu hormonlar 4. günde ovulasyon gerçekleştiğinde (yani östrus) başlangıç seviyelerine döner. Son olarak östrus akşamı kısa süreli geçici bir E_2 zirvesi yaşanır [31].



Şekil 10. A.Farede yaşamın farklı dönemlerinde gonadotrop ekseninin düzenlenmesi. FSH (yeşil çizgi) ve LH (mavi çizgi). Doğumdan sonra maternal östradiol yavru serumundan azalır ve bu durum östradiol negatif geri bildiriminin kaybolmasına ve mini puberte döneminde gözlenen gonadotropin seviyelerinde dramatik artışa yol açabilir. Mini pubertede gonadotropin artışı ovaryum tarafından östradiol üretiminin artmasına katkıda bulunur (sürekli pembe çizgi). Bundan sonra, doğumdan sonra alfa-fetoprotein (AFP)'deki azalma ve inhibin negatif geri bildiriminin olgunlaşması, ergenliğe kadar düşük kalan gonadotropin seviyelerinde gözlenen düşüşe katkıda bulunabilir. Üreme hayatı boyunca, gonadotropin seviyeleri hem estradiol negatif hem de pozitif geri bildirim ile düzenlenir. Yaşlı farelerde östradiol negatif geri bildirimi zayıflar, böylece gonadotropin seviyeleri artar. B.Farede prepubertal dönemin farklı aşamaları; yenidoğan, infantil ve juvenil dönemleri gösterilmektedir. Mini puberte infantil dönem içinde gerçekleşir. C.Östrus döngüsünün farklı aşamalarında prepubertal ve yetişkin dişi farelerde gonadotropin ve östradiol seviyeleri, postnatal 27.güne kadar bakılmış ve sonrasında prosöstrus, östrus ve diöstrus dönemlerinde analiz edilmiştir. İnfantil döneme ait hormon seviyeleri mavi çubuklarla gösterilmiştir [32].

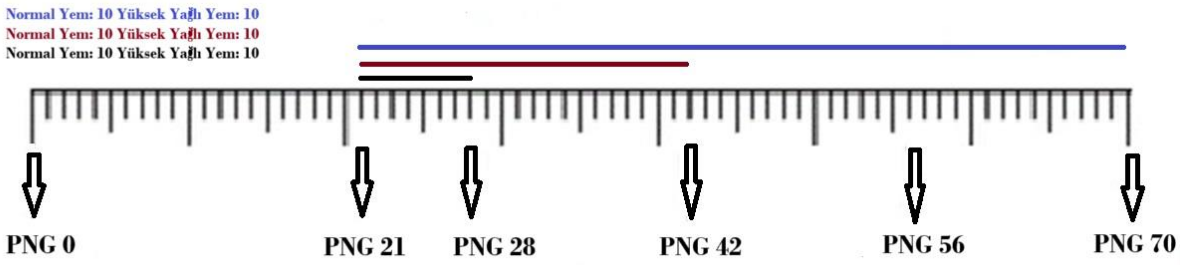
5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Süreci

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 15/06/2022 tarihli 2022-12-115 numaralı kararı ile gerçekleştirilerek, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün TTU-2023-2764 proje numarası ile desteklendi.

Çalışmamızda kullanılan hayvanların üretimi ve temini Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan yapılıp, deneyler aynı laboratuvarda tamamlandı. Çalışmada 60 adet Yavru Dişi Wistar sıçan kullanılmıştır, sıçanlar standart çevre koşullarına (oda sıcaklığı: 25±2 C, bağıl nem oranı: %55 ±5) sahip odalarda yem ve suya serbest erişimi olan pleksicam kafeslerde 12 saatlik aydınlık / karanlık döngüsünde barındırıldı.

Yavru sıçanların doğdukları gün, doğum sonrası (postnatal) sıfırıncı gün, 'PNG 0', olarak değerlendirildi. Sıçanlar normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen grup olmak üzere ikiye ayrıldı. Normal yem ile beslenen sıçanlar kcal (%) cinsinden % 5,27 yağ, %70,73 karbonhidrat ve %24 proteinden oluşan standart sıçan yemi ve su ile ad libitum beslendi. Yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanlar kcal (%) olarak %60 yağ, %20 protein ve %20 karbonhidrattan oluşan sıçan yemi ve su ile ad libitum beslendi. Daha sonra her grup kendi içinde puberte öncesi, puberte ve puberte sonrası olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı. Grupların beslenme şekli ve aralıkları aşağıda verilen şekil ve tabloda ayrıntılı olarak sunulmaktadır (Şekil 11), (Tablo 2).



Şekil 11. PNG (postnatal gün) 21 ve PNG 28 arası 10 adet yüksek yağlı yem ve 10 adet normal yem ile beslenen, PNG 21 ve PNG 42 arası 10 adet yüksek yağlı yem ve 10 adet normal yem ile beslenen, PNG 21 ve PNG 70 arası 10 adet yüksek yağlı yem ve 10 adet normal yem ile beslenen toplam 60 adet dişi sıçan kullanıldı. PNG 21-28: Puberte öncesi dönem, PNG 21-42: Puberte dönemi, PNG 21-70: Puberte sonrası dönem olarak gruplar belirlendi.

Tablo 2. Deney Grupları

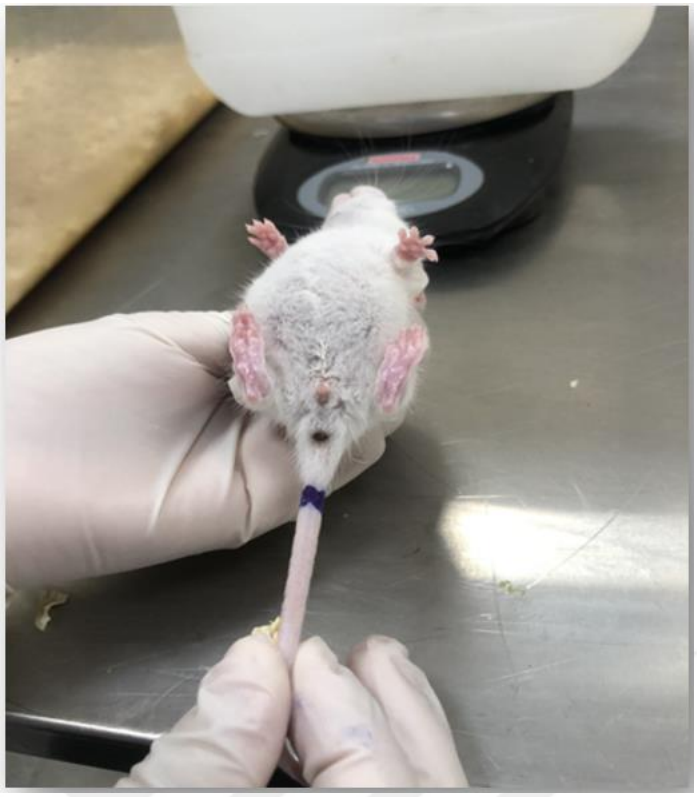
Grup Numarası	Postnatal Gün Beslenme Aralığı	Sakrifikasyon tarihlerine göre puberte evresi
G1	Png 21-28 (normal yem)	Prepuberte Dönemi
G2	Png 21-42 (normal yem)	Puberte Dönemi
G3	Png 21-70 (normal yem)	Postpuberte Dönemi
G4	Png 21-28 (yüksek yağlı yem)	Prepuberte Dönemi
G5	Png 21-42 (yüksek yağlı yem)	Puberte Dönemi
G6	Png 21-70 (yüksek yağlı yem)	Postpuberte Dönemi

5.1.1. Antropometrik Ölçümler

Tüm sıçanların ağırlığı, PNG 21'den başlayarak sakrifikasyon gününe kadar beş günde bir ölçüldü.

5.1.2. Puberte Tayini

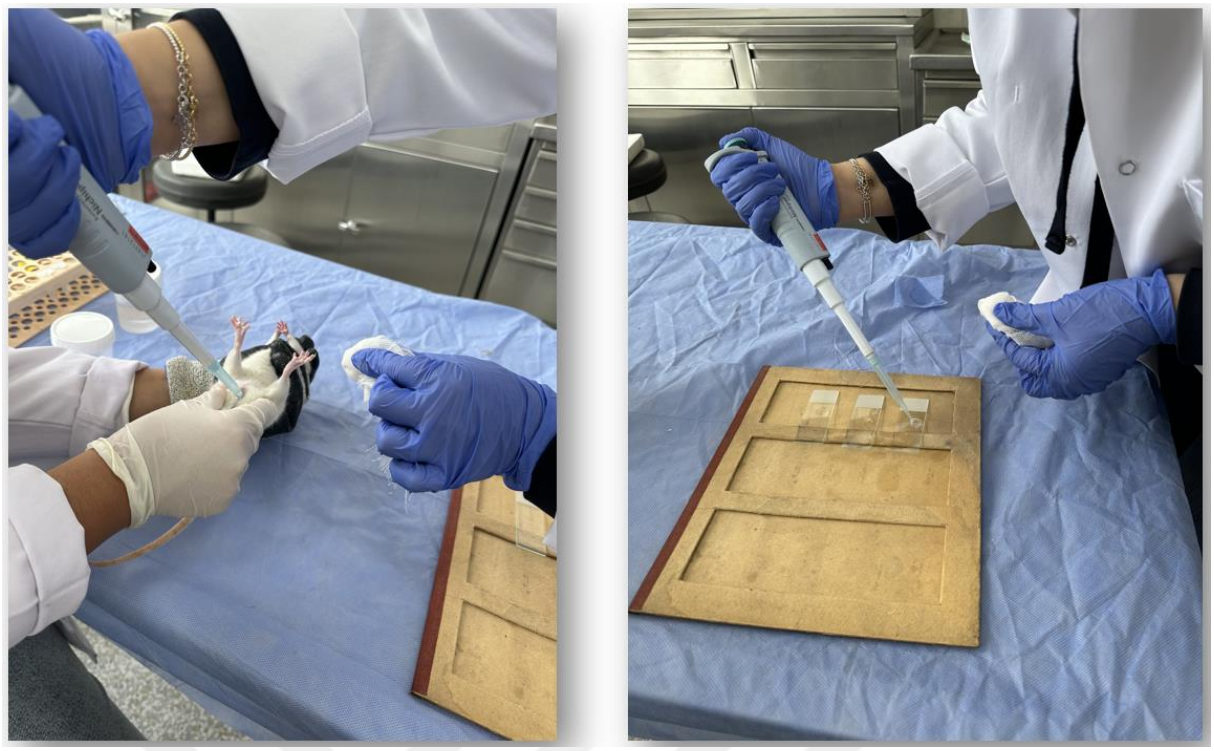
PNG 22' den başlayarak tüm sıçanların vulvası suyla nemlendirilmiş gazlı bez ile nazikçe temizlenip vajinanın tamamen açık olup olmadığı, vaginal açıklık saptanana kadar her gün kontrol edildi. Vajinal açıklık saptandıktan sonra puberteye girdikleri kabul edilip, ilk 'östrus' dönemi tayini için vajinal smear alındı (Şekil 12).



Şekil 12. Sıçanlarda vajinal açıklığa bakılması.

5.1.3. Vajinal Yıkama ile Vajinal Yayma Yapılması

İşlem için sıçanlar kuyruğunun dibinden tutularak sabitlendi. Pipet 150 µl distile su (dH2 O) ile doldurularak vulva ve vajen bu su ile dikkatle 2-3 kez, aynı suyun tamamı pipetle geri çekilerek yıkandı. Pipetteki su, vulva ve vajendeki hücreleri içerdiğinden dikkat ile toplandı. Pipet içeriği lam üzerine boşaltılıp, kendi haline bırakılarak kurutuldu (air-dry). Vajinal yıkama sırasında servikal ve çevre yapılardan kaynaklanan kontaminasyon riskini azaltmak için vulva ve çevresinin işlem yapılırken temiz olmasına dikkat edildi (Şekil 13).



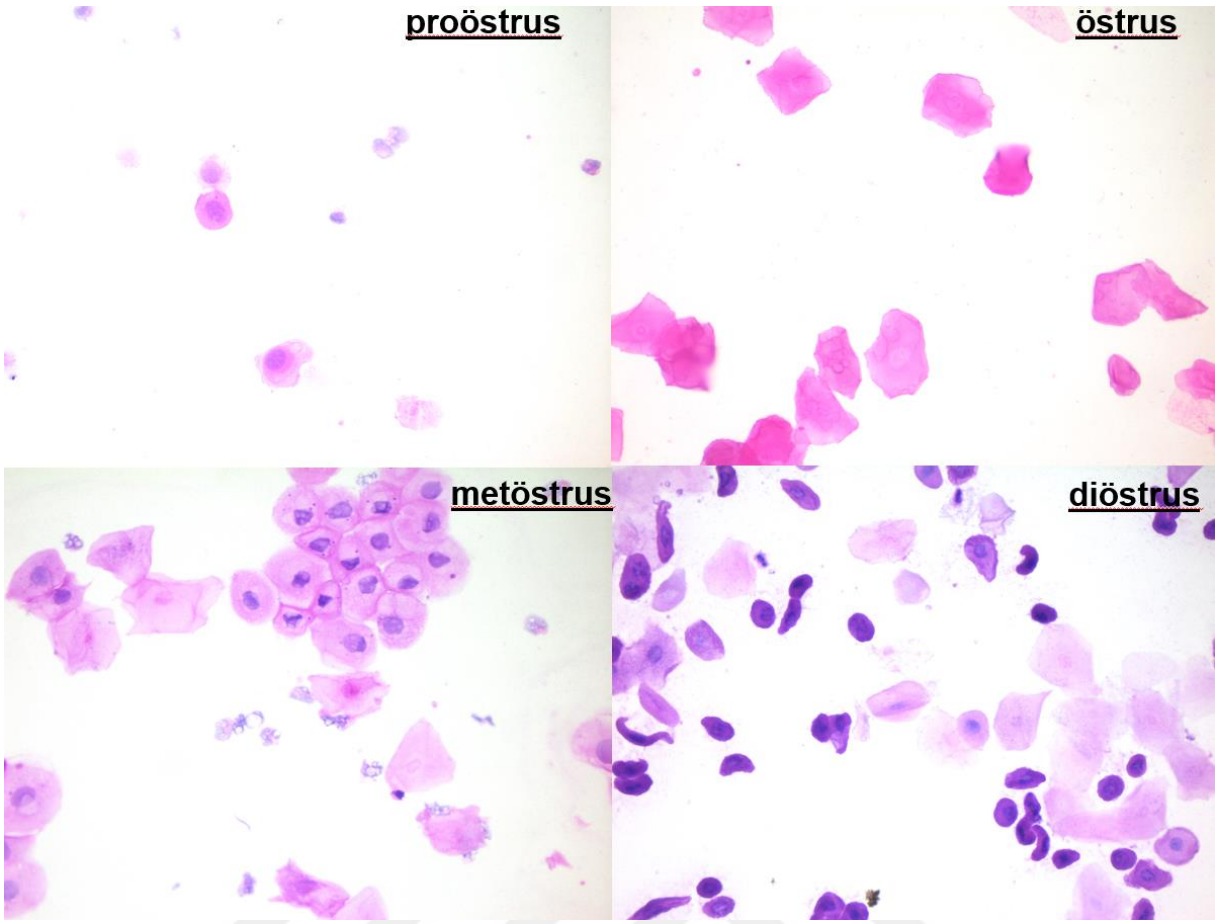
Şekil 13. Vajinal açıklık saptanan sıçanlardan vajinal smear alınması.

5.1.4. Vajinal Yaymanın Hematoksilin-Eosin ile Boyanıp, Östrus Siklusunun Değerlendirilmesi

Alınan örnekler tamamen kuruduktan hemen sonra her bir aşama 30 saniye sürecek şekilde sırasıyla %96'lık alkol, distile su, hematoksilin, distile su, eozin, distile su ve %96'lık alkol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatıldı. Örnekler Axio Scope A1 marka ışık mikroskobu ile incelenerek fotoğraflandı.

5.2. Vajinal Smear Örnekleri ile Östrus Döngüsü Değerlendirilmesi

Vajinal smear değerlendirmesinde; proöstrus döneminde, merkezi nükleusları olan dış hatları oval epitel hücreleri ve nadir lökositler izlendi. Östrus döneminde, çekirdeklerini kaybetmiş kornifiye epitel hücreleri gözlendi. Metöstrus döneminde bol çekirdekli poligonal hücreler ve lökositler bulunmaktaydı. Diöstrus döneminde, bol miktarda epitel hücreleri ve lökosit gözlendi. (Şekil 14).



Şekil 14. Wistar Albino Sıçanlarda Östrus Döngüsünün farklı dönemlerine ait vajinal smear örnekleri izlenmektedir.

5.3. Ovaryum ve Beyaz Yağ Dokusunun Alınması ve Histolojik Takibi

Deney gruplarına en az 12 saat açlık sağlandıktan sonra PNG 28, PNG 42 ve PNG 70'te yüksek doz anestezi (Ksilazin (XYLAZİNBİO %2/Bioveta)-10 mg/kg intraperitoneal+Ketamin (Keta-Control/ Doğa ilaç)-90 mg /kg intraperitoneal) uygulandı. Sıçanlar anestezi altındayken deney sonu canlı ağırlıkları tartılıp kaydedildi.

Anestezi sonrası ötenazisi gerçekleşen sıçanlar sakrifiye edildi. Ovaryum ve subkutan beyaz yağ dokusu alınarak SF (serum fizyolojik) ile yıkandıktan sonra histolojik değerlendirmeler için ovaryum dokuları Bouin's solüsyonuna, yağ dokuları %10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonuna alındı ve 24-72 saat süreyle fikse edildi (Şekil 15).



Şekil 15. Deney gruplarına ait sıçanlardan ovaryum ve yağ dokusunun alınması.

5.4. Işık Mikroskobik (IM) İncelemeleri İçin Doku Takibi

5.4.1. Ovaryum Dokusu ve Bouin Takibi

Çalışma gruplarından alınan ovaryum dokusu örnekleri Bouin's solüsyonu ile 24 saat tespit edildi. Dokular, dereceli alkol aşamalarında çalkalayacı (Heidolph 10030) üzerinde tekrarlayan günlerde 24 saat süreyle %70'lik etil alkole, ikinci gün %80'lik etil alkole, üçüncü gün %90'lık etil alkole alındı. Dördüncü gün %100'lük etil alkolde 3 saat bekletildikten sonra dokular şeffaflandırmak için ksilene alınanarak kontrollü olarak saydamlaştırıldı ve 60 ^{0}C'lik etüvde sıvı parafinle 3 saat inkübe edildi. Bu işlemlerin ardından parafin bloklara gömüldü ve oda sıcaklığında sertleşmesi beklendi. Sertleşen parafin bloklar +4 ^{0} C'de kesit alınana kadar muhafaza edildi. Önceden poly-l-lysin kaplanan lamlara her örnekten sliding mikrotom (Leica RM 2125RT) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitlerin boyama işlemi yapılmadan önce 60 ^{0}C lik etüvde bir gece bekletilerek deparafinizasyonları sağlandı. Boyamaya hazır hale gelen kesitler Hematoksilin-Eozin (HE) ve SPX immunboyama ile boyandı.

5.4.2. Yağ Dokusu %10 Fosfat Tamponlu Formalin Takibi

Çalışma gruplarından alınan subkutan beyaz yağ dokusu örnekleri %10 fosfat tamponlu formalin ile 72 saat fikse edildi. Tespit aşaması tamamlanan dokular dehidratasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlem dahilinde önce dokular akar su altında bekletilerek formaldehit uzaklaştırıldı. Tekrarlanan aşamalarda dereceli etanoller tazelenerek; %75'lik etanolde 2 kez 60 dakika; %96'lık etanolde 60 dakika ve 1 gece, %100' lük etanolde ise 2 kez 60 dakika bekletildi. Dehidratasyon işlemi tamamlandıktan sonra dokular ksilene alınarak 1-2 dakika bekletildi. Şeffaflaşan doku örnekleri 60 ^{0}C' lik etüvde sıvı parafinle 4 saat inkübe edildi. Bu işlemlerin ardından parafin bloklara gömüldü ve oda sıcaklığında sertleşmesi beklendi. Sertleşen parafin bloklar +4 ^{0} C'de kesit alınana kadar muhafaza edildi. Önceden poly-l-lysin kaplanan lamlara her örnekten sliding mikrotom (Leica RM 2125RT) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitlerin boyama işlemi yapılmadan önce 60 ^{0}C lik etüvde bir gece bekletilerek deparafinizasyonları sağlandı. Boyamaya hazır hâle gelen kesitlere Hematoksilin Eozin ve immunohistokimyasal işaretlemeler aşağıdaki prosedürlere uygun olarak gerçekleştirildi.

5.4.3. Hematoksilin-Eozin (HE) Boyama Prosedürü

- Kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dakika ksilende bekletildi.
- Kesitler sırasıyla %100, %96 ve %75 etanol serilerinde iki dakika bekletildikten sonra distile suya alındı.
- Hematoksilin solüsyonu ile bir dakika boyandıktan sonra çeşme suyuna alındı.
- Eozin solüsyonuna alınan kesitler üç dakika boyandıktan sonra yeniden suya alınanarak yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Boyama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler %75, %96, %100' lük dereceli etanol serisinde sırasıyla 2 dakika süreyle dehidrate edildi.
- Ksilen ile en az 30 dakika şeffaflandırma işlemi yapıldı.
- Kesitler entellan ile kapatıldı.

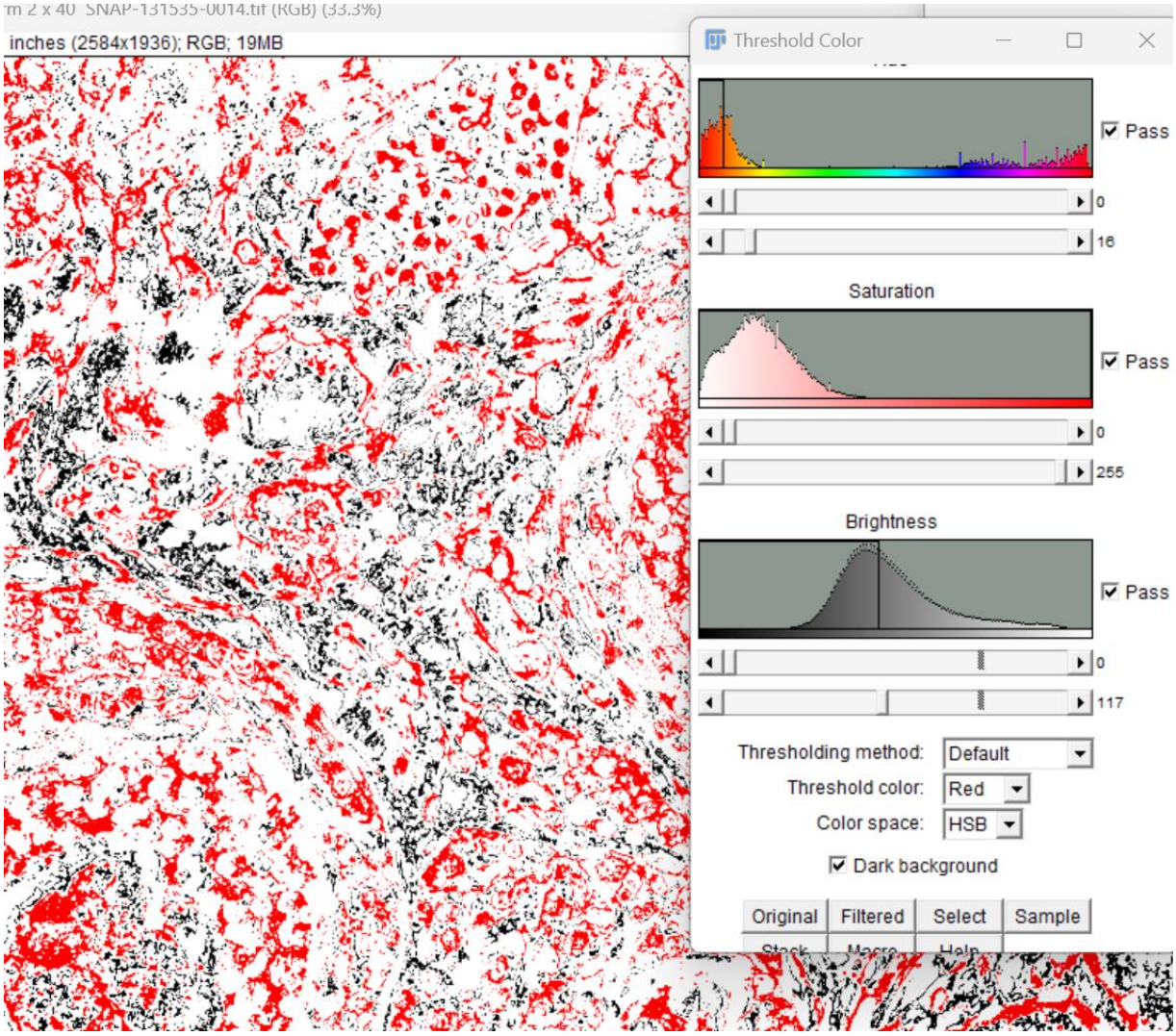
Normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen prepuberte, puberte ve postpuberte gruplarından elde edilen ovaryum ve beyaz yağ dokusu preparatları Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Germany) ışık mikroskobu kullanılarak incelendi. Dijital görüntüler Axiovision bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi.

5.4.4. İmmünohistokimya İçin İşaretleme Prosedürü

- Kesitler ksilen ile 20 dakika deparafinize edildi.
- %100, %96, %75 etanol serilerinde 5' er dakika hidrasyon işlemi yapıldı, 5 dk dH_2O ile yıkandı
- Formaldehitin kapattığı epitopları açmak için sitrat solüsyonu (Merck 1.06448.1000, Ph:6) ile ısı ve basınç altında antijen açığa çıkarma işlemi yapıldı
- PBS (Phospat Buffer Saline) ile 3x5 dakika yıkandı.
- Dokuların etrafı pappen ile çizildi.
- Hidrojen Peroksidaz ile endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 10 dakika muamele edildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- Bloklama solüsyonu damlatılıp 30 dakika beklendi.
- Spexin / NPQ Antikoru (Phoenix pharmaceuticals, Cat:H-023-81) 1:500 oranında PBS ile sulandırılarak damlatıldı ve $+4^0$C'de 1 gece inkübe edildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı.
- Sekonder antikor damlatıldı ve 1 saat oda ısısında tutuldu
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı
- Streptavidin-peroksidaz kompleksi ile 30 dakika muamele edildi.
- PBS ile 3x5 dakika dakika yıkandı.
- DAB (3,3'diaminobenzidine) ile 1-3 dakika arasında değişen sürelerde bekletildi.
- PBS ile 3x5 dakika yıkandı
- Mayer's Hematoksilin damlatılıp sonrasında distile suya daldırıldı.
- %75, %96, %100 etanol serilerinde ikişer dakika dehidratasyon işlemi yapıldı.
- Ksilende 20 dakika şeffaflandırıldı.
- Entellan ile kapatıldı.

5.4.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Her gruptan SPX primer antikoruyla boyanan ovaryum dokusu preparatlarından rastgele seçilen 40 X büyütmede 6 alanın fotoğrafları çekildi [33]. Her gruptan SPX primer antikoruyla boyanan yağ dokusu preparatlarından rastgele seçilen 40 X büyütmede 4 farklı alan fotoğrafları çekildi [34]. Image J Fiji software programı kullanılarak, çekilen fotoğrafların boyanma yoğunluğuna göre protein ekspresyon (%) değerleri tespit edildi (Şekil 16).



Şekil 16. Image J programı ile boyanma yoğunluğu ölçülerek SPX protein ekspresyonu (%) değerinin belirlenmesi.

5.5. Geçirimli (Transmisyon) Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntülemesi İçin Yapılan Çalışmalar

Ovaryum ve subkutan beyaz yağ dokusu örnekleri %2,5'luk gluteraldehit içerisine alınarak TEM için tespit ve takip işlemleri uygulandı.

- 0.2 M fosfat tamponu içerisinde %2,5 gluteraldehit ve %2 paraformaldehit (pH=7.2-7.4) solüsyonlarında +4 ^{0}C' de 2-4 saat süreyle birinci tespit işlemi yapıldı.
- 0,1 M fosfat tamponunda 2x15 dakika boyunca rotatorda yıkandı.
- Karanlık ortamda 0,1M fosfat tamponda %1 OsO_4 solüsyonu ile rotatorda 2 saat boyunca ikinci tespit uygulandı.
- 0,1 M fosfat tamponda 3x20 dakika yıkandı.
- Distile su ile yıkama işlemi uygulandı.

- %70 etanolde % 0,05 uranil asetat ve % 1 fosfotungustik asit ile blok boyama işlemine karanlık ortamda ve rotatorda 2 saat süresince devam edildi.
- %70, %96, %100 etanol serileri ve propilenoksit dehidratasyon için kullanıldı.
- 1:1 oranında propilen /Araldit karışımı ile rotatorda 1 saat muamele edildi.
- 2 saat boyunca Araldit içinde tutuldu.
- Blok kalıbı içerisine doku konuldu, üzerine araldit eklendi.
- Hazırlanan bloklar 80 ºC'de etüvde 1 gece süre ile polimerizasyon işlemine tabi tutuldu.
- İşlem sonunda bloklar etüvden çıkarılıp soğumaya bırakıldı.

Bloklardan kesitler Leica Ultracut R marka ultramikrotom (Leica,Solms,Germany) ile alındı. Yarı ince ışık mikroskobi incelemesi için alınan 1 mikrometre kalınlığında kesitler toluidin mavisi-azur ll ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Ultrastrüktürel yapının gözlenmesi amacıyla alınan 70-90 nm kalınlığında kesitler gride alındı ve aşağıdaki protokole uygun olarak boyandı.

5.5.1. İnce Kesit Boyama Protokolü

- Alınan kesitler boyama setine yerleştirildi.
- d H_2O ile 1-2 dakika yıkandı.
- 45 dakika boyunca %8'lik uranil asetat ile boyandı.
- d H_2O ile 1-2 dakika yıkandı.
- 0,1 N NaOH içerisinde yıkandı.
- İkincil boyama için %0,7 kurşun sitrat / %0,9 sodyum sitrat solüsyonunda 20 dakika tutuldu.
- 0,1 N NaOH içerisinde yıkandı.
- d H_2O ile 1-2 dakika yıkandı**.**

Hazırlanan gridlerin incelemeleri Hitachi 7800 model geçirimli elektron mikroskobu ile yapıldı. Görüntülemeler EMIP dijital görüntü programı ile değerlendirildi.

5.6. Biyokimyasal Analiz

Deney bitiminde genel anestezi altında intrakardiyak kan alımı ile elde edilen serum örneklerinde; Serum SPX, kisspeptin, leptin ve soluble leptin reseptörü, LH, FSH, östrodiol ve total testosteron, serbest IGF-1, açlık insülin ve açlık kan şekeri düzeylerinin ölçümleri yapıldı.

Serum glikoz düzeyleri, Roche COBAS c702 otoanalizör cihazı ile hekzokinaz [35, 36] metoduyla çalışıldı. Birimi mmol/L olarak ifade edilmiştir. FSH, LH, Östradiol, Testesteron hormonları Roche COBAS 8000 otoanalizöründe elektrokemilüminesans immunoassay (ECLIA) yöntemi ile çalışıldı. FSH, LH, Östradiol ve Testesteron birimleri sırası ile mIU/mL, mIU/mL, pg/mL, ng/mL olarak ifade edildi. IGF-1 ve İnsülin Snibe Diagnostic Maglumi X3 cihazı ile sandviç kemilüminesans immunassay metoduyla ölçüldü. IGF-1 ng/mL, İnsülin ise µIU/mL olarak ifade edildi. Sıçan Leptin, Kispeptin, Speksin ve s-leptin ölçümleri Shanghai Sunred Biological Technology Co. Kiti ile BioTek Epoch 2 Microplate Reader ELISA cihazı ve BioTek 50 ts Microplate Washer yıkayıcısı kullanılarak sandviç ELISA metoduyla yapıldı. Leptin, Speksin ve s-leptin sonuçları pg/mL, Kispeptin ise ng/L olarak ifade edildi.

Tüm serum örnekleri Ankara Üniversitesi İbni Sina Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve Endokrinoloji Laboratuvarında analiz edildi.

5.7. HOMA-ID (İnsülin Direnci) Hesaplanması

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde açlık insülin ve açlık glikoz değerleri üzerinden HOMA-ID indeksi hesaplandı.

- Açlık insülin, Sıçan İnsülin ELISA kiti ile 5 µL numune hacmi kullanarak ölçüldü.
- HOMA-ID indeksi değeri açlık kan şekeri x açlık insülin/ 22.5 formülü ile hesaplandı.

5.8. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler; nicel değişkenler için normal dağılıma uygunluk durumuna göre ortalama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum), nitel değişkenler için ise frekans (yüzde) olarak sunuldu.

Tüm deney gruplarının vajinal açıklık zamanı**,** Δ ağırlık/ilk ağırlık, sakrifikasyon ağırlıkları, Image J programı ile SPX boyanma protein ekspresyonu, serum LH, FSH, Açlık

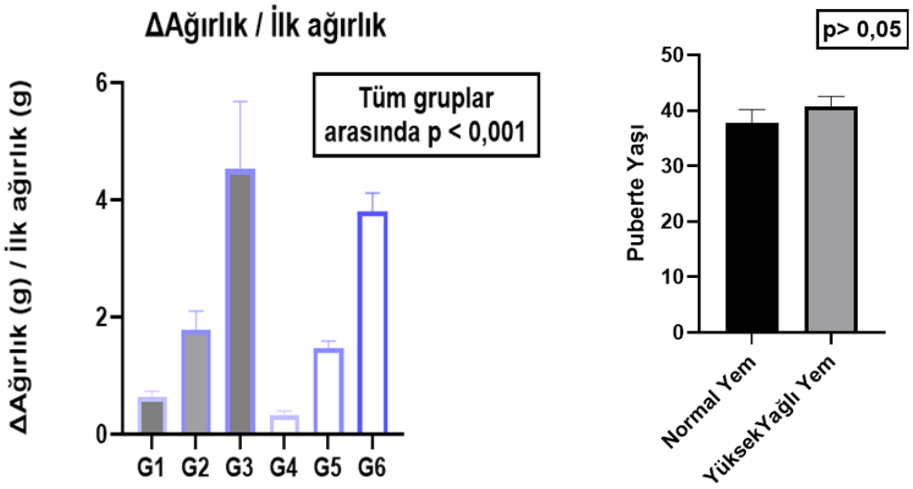
İnsülin, Leptin, Soluble Leptin, Östrodiol, Speksin, Serbest IGF-1, Kisspeptin, Total Testosteron ve Açlık Kan Şekeri Ölçümü değerleri gibi nicel değişkenlerin değerlendirilmesinde One Way ANOVA, Kruskal Wallis ve Independent t testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilip analizlerin gerçekleştirilmesinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Versiyon 15.0, Chicago,IL.) kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1. Sıçanların Sakrifikasyon Ağırlıkları, Δ Ağırlık/ilk Ağırlık Değerleri, Vajinal Açıklık Zamanları ve Serum Hormon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

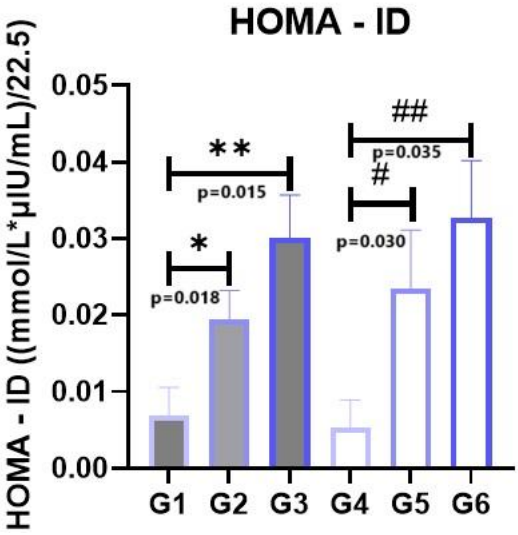
Beslenme biçimlerine göre, dönemler arası sakrifikasyon ağırlıkları ve Δ Ağırlık / İlk ağırlık değerlerinde postpubertal döneme doğru artış gözlenip, aynı beslenen gruplar içinde anlamlı fark bulundu (her ikisi için $p<0.001$). Δ Ağırlık / İlk ağırlık değerlerini prepuberte ve puberte dönemlerinde normal yem ile beslenen grubu yüksek yağlı yem ile beslenen grup ile karşılaştırdığımızda normal yem grubunun anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla $p<0.001$, $p<0.019$) (Şekil 17) (Tablo 3).

Sıçanların normal ve yüksek yağlı yem ile beslenmeye göre vajinal açıklık zamanlarında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 17) (Tablo 3).



Şekil 17. Sıçanların beslenme ile ilişkili puberte zamanı (vajinal açıklık) ve ΔAğırlık/İlk ağırlık ilişkisi gruplar arasında grafi ile ifade edilmiştir.

Sıçanların HOMA- ID değerleri incelendiğinde normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda prepuberteden puberteye geçişte anlamlı artış izlendi (sırasıyla $p=0.018$ ve $p=0.030$) Normal yem ve yüksek yağlı yem gruplarında prepuberte ve postpuberte dönemleri arasındaki fark anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.015$ ve $p=0.035$) (Tablo 3) (Şekil 18).



Şekil 18. Sıçanların HOMA-ID değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir.

Tablo 3. Normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanlarda vajinal açıklık zamanları, sakrifikasyon ağırlığı, Δ ağırlık/ilk ağırlık değerleri ve HOMA-ID değerlerine ait gruplar arası istatistiksel veriler

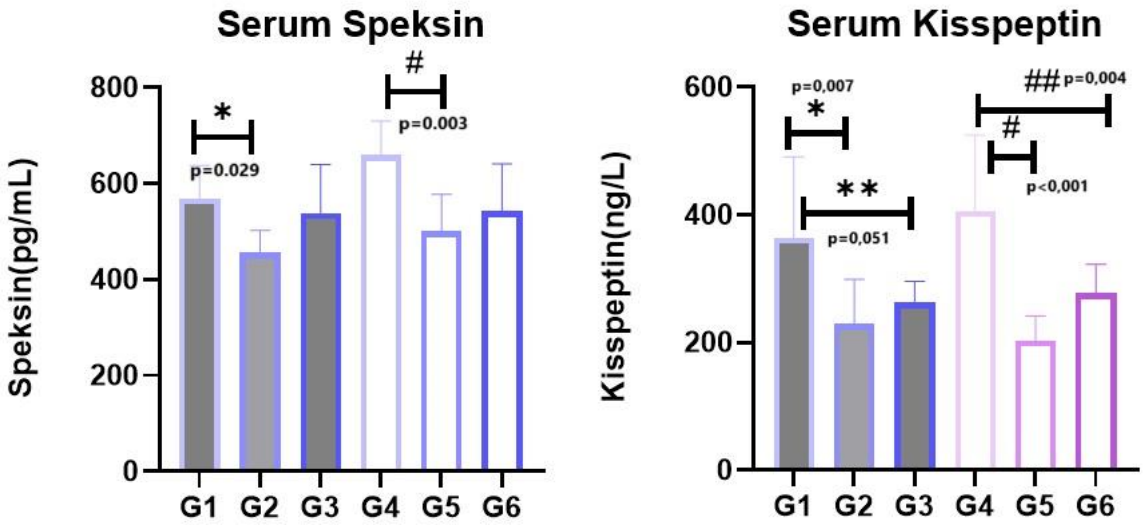
			Yem türü		
	Dönem	n	Normal	Yüksek Yağlı	İstatistik
			Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	p*
Sakrifikasyon Ağırlığı	Prepuberte D. (G1-G4)	10	46,3 ± 5,5 50,5(40-53)	50,5 ± 11,3 54(39-69)	p>0.05
	Puberte D. (G2- G5)	10	98,7 ± 7,1 100(89-110)	93,7 ± 8,4 86,5(80-108)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	183,9 ± 14,1 167(162-211)	181 ± 8,9 190,5(168-196)	p>0.05
	p¥		p<0.001	p<0.001	
Δ ağırlık/ilk ağırlık	Prepuberte D. (G1-G4)	10	0,64 ± 0,09 0,71(0,54-0,77)	0,32±0,08 0,30 (0,22- 0,43)	p<0.001
	Puberte D. (G2- G5)	10	1,78 ± 0,32 2,10(1,41-2,32)	1,47±0,12 1,50 (1,20- 1,58)	p=0.019
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	4,52 ± 1,15 4,57(3,25-6,72)	3,80±0,31 3,81 (3,26 - 4 ,30)	p>0.05
	p¥		p<0.001	p<0.001	
Vajinal açıklık zamanı	Prepuberte D. (G1-G4)	10	-	-	
	Puberte D. (G2- G5)	10	36,2 ± 2,4404 37,5(32-40)	39±2,05 39,5 (35- 41)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	39,5 ± 2,63523 42(35-42)	42,44±1,13 42 (41- 45)	p>0.05
	p¥		p=0.009	p<0.001	
HOMA – ID	Prepuberte D. (G1-G4)	10	0,006±0,003 0, 007 (0.00-,0.01)	0,005±0.003 0,004(0,001-0,010)	p>0.05
	Puberte D. (G2- G5)	10	0,019±0,003 0,020(0.015-0.02)	0,023±0,007 0,027(0,014-0,028)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	0,030±0,005 0,027 (0.02- 0.03)	0,032±0,007 0,035(0,024-0,038)	p>0.05
	p¥		p=0.018	p=0.030	

Normal yem ile beslenen sıçanlarda (Tablo 4) (Şekil 19, 20, 21);

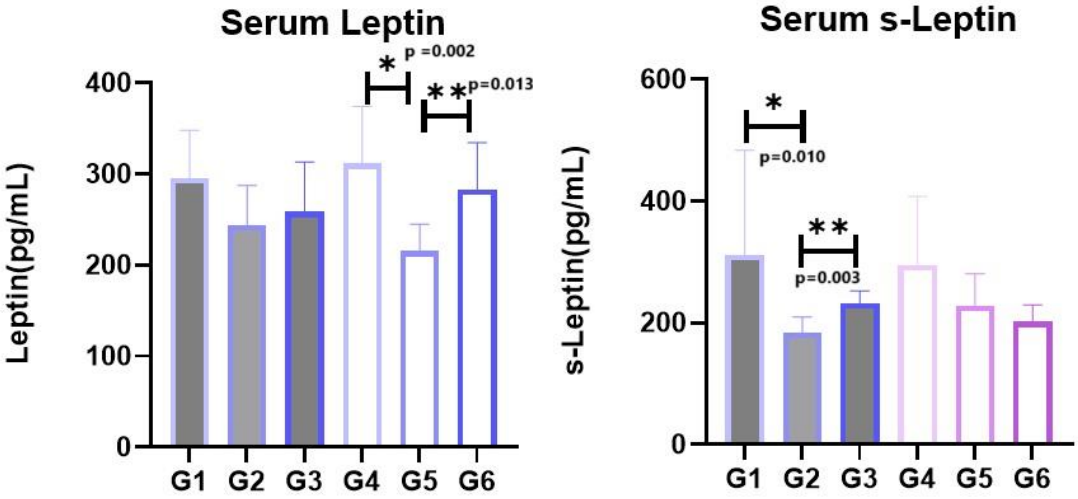
- Serum kisspeptin ve SPX düzeylerinde; prepuberte, puberte ve postpuberte dönemleri arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla p=0.008, p=0.018). Serum kisspeptin, speksin ve s-leptin düzeylerinde prepuberteden puberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (sırasıyla p=0.007, p=0.029 ve p=0.010).
- Serum s-leptin düzeyinde puberte döneminden postpuberte dönemine geçişte anlamlı artış gözlendi (p=0.003).
- Serum LH düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklıydı (p=0.001). Puberteden postpuberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (p=0.006), prepuberte ile postpuberte dönemleri arasındaki fark anlamlı olarak azaldı (p=0.002).
- Serum insülin düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (p=0.024).
- Serum leptin, IGF-1, glikoz ve östrodiol seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı (p>0.05).
- Serum testosteron ve FSH düzeyleri tüm gruplarda cihazda ölçülemeyecek kadar düşük düzeyde saptandı (sırasıyla <2,5 test, <0,300 test).

Yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanlarda (Tablo 4) (Şekil 19, 20, 21);

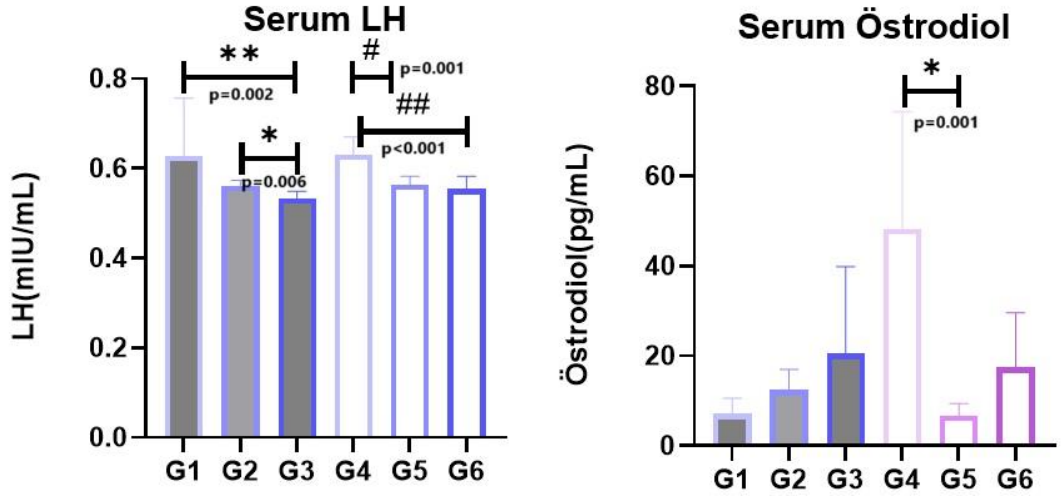
- Serum SPX düzeyinde prepuberteden puberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (p=0.003).
- Serum kisspeptin düzeyi prepuberteden puberteye geçişte anlamlı azalma, prepuberte ile postpuberte arasında ise anlamlı fark bulundu (sırasıyla p<0.001, p=0.004).
- Serum leptin düzeyi prepuberteden puberte dönemine geçişte anlamlı derecede azalmış gözlenip, puberteden postpuberteye geçişte anlamlı artış bulundu (sırasıyla p=0.002, p=0.013).
- Serum LH düzeyi prepuberteden puberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (p=0.001), prepuberte ile postpuberte dönemleri arasındaki fark anlamlı olarak azaldı (p <0.001).
- Serum s-leptin ve IGF1 değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).
- Serum glikoz ve insülin düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (her ikisi için p=0.035).
- Serum östrodiol düzeyi prepuberteden puberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (p=0.001).
- Serum testosteron ve FSH düzeyleri tüm gruplarda cihazda ölçülemeyecek kadar düşük düzeyde saptandı (sırasıyla <2,5 test, <0,300 test).



Şekil 19. Sıçanların serum speksin ve kisspeptin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir.



Şekil 20. Sıçanların serum leptin ve s-leptin düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir.



Şekil 21. Sıçanların serum LH (Luteinizan Hormon) ve Östrodiol (E_2) düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile ifade edilmiştir.

Tablo 4. Deneklerde serum hormon seviyelerine ait gruplar arası istatistiksel veriler

			Yem türü		
	Dönem	n	Normal	Yüksek Yağlı	İstatistik
			Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	p*
Leptin_Kons (pg/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	295,5 ± 52,70199 254,92(245-391)	311,6667 ± 62,83523 368,87(207-373)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	244 ± 43,37178 234,13(181,94-317)	215,5 ± 29,60574 211,64(185-277)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	258,6 ± 54,88817 256,95(202,31-347)	282,7 ± 51,85675 324,73(191-343)	p>0.05
	p¥		p=0.158	p=0.001	
Kisspeptin (ng/L)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	364,1667 ± 126,3478 363,40(204-518)	405,3333 ± 120,136 377,33(285-574)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	229,3 ± 69,93815 176,57(154-401)	202,9 ± 38,97136 165,93(145-262)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	262,8 ± 33,00774 224,62(199-312)	277,3 ± 45,50714 318,30(205-340)	p>0.05
	p¥		p=0.008	p<0.001	
Speksin (pg/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	568,3333 ± 69,33013 624(461-646)	659,83±71,44 647 (578- 783)	p=0.048
	Puberte D. (G2-G5)	10	456,6 ± 45,69756 455(377-526)	500,50±77,29 528 (380- 601)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	538,7 ± 101,3268 585,55(388-732)	542,10±99,78 558,50 (296- 652)	p>0.05
	p¥		p=0.018	p=0.005	
IGF1 (ng/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	14,2783 ± 4,51188 15(8,08-21,92)	13,4633 ± 2,36912 14,23(11,22-17,36)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	10,5095 ± 5,71279 9,7(0,61-18,78)	12,918 ± 5,53581 16,47(3,04-21)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	10,229 ± 3,26172 13,89(6,18-14,71)	12,829 ± 3,5742 9,39(7,14-18,52)	p>0.05
	p¥		p=0.212	p=0.956	
İnsulin (µIU/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	0,023±0,008 0,0242(0,011-0,0324)	0.023±0,013 0,022(0,007-0,038)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	0,067±0,019 0,071(0,046-0,084)	0,067±0,021 0,070(0,045-0,086)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	0,088±0,010 0,084(0,081-0,100)	0,082±0,002 0,081(0,080-0,084)	p>0.05
	p¥		p=0.024	p=0.035	

Tablo 4. (devam) Deneklerde serum hormon seviyelerine ait gruplar arası istatistiksel veriler

			Yem türü		
	Dönem	n	Normal	Yüksek Yağlı	İstatistik
			Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	p*
Glikoz (mmol/L)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	6,230±2,101 6,799(3,274-8,048)	5,106±0,662 5,051(4,384-5,939)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	6,642±0,715 6,438(6,050-7,437)	7,804±0,684 7,437(7,382-8,594)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	7,715±1,835 7,326(6,105-9,713)	8,917±1,911 9,880(6,716-10,157)	p>0.05
	p¥		p=0.789	p=0.035	
S-leptin (pg/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	312,00±171,56 232,5 (201- 648)	294,16±113,64 240,50 (226- 518)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	183,70±26,29 180 (144-223)	227,10±53,47 245,50 (141- 287)	p=0.033
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	232,90±20,04 232,50(201- 265)	201,70±27,99 200(155- 247)	p=0.01
	p¥		p=0.001	p=0.054	
LH (mIU/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	0,62±0,12 0,5760 (0.56, 0.89)	0,6294 ± 0,04077 0,63(0,60-0,69)	p>0.05
	Puberte D. (G2-G5)	10	0,56±0,01 0,5620 (0.54, 0.58)	0,5631 ± 0,01939 0,56(0,54-0,59)	p>0.05
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	0,53±0,01 0,5275 (0.52, 0.56)	0,5537 ± 0,02856 0,57(0,52-0,61)	p>0.05
	p¥		p=0.001	p<0.001	
Östrodiol (pg/mL)	Prepuberte D. (G1-G4)	10	7,11±3,46 5 (5-13,10)	48,22±26,16 41,70 (19,30- 81,70)	p=0.004
	Puberte D. (G2-G5)	10	12,43±4,51 13,10 (5-18,10)	6,63±2,70 5 (5- 11,8)	p=0.003
	Postpuberte D. (G3-G6)	10	20,51±19,36 12,78 (5- 60,20)	17,46±12,19 13,25(5- 33,80)	p>0.05
	p¥		p=0.122	p=0.002	

¥ Kruskal Wallis Testi * Mann Whitney U Test

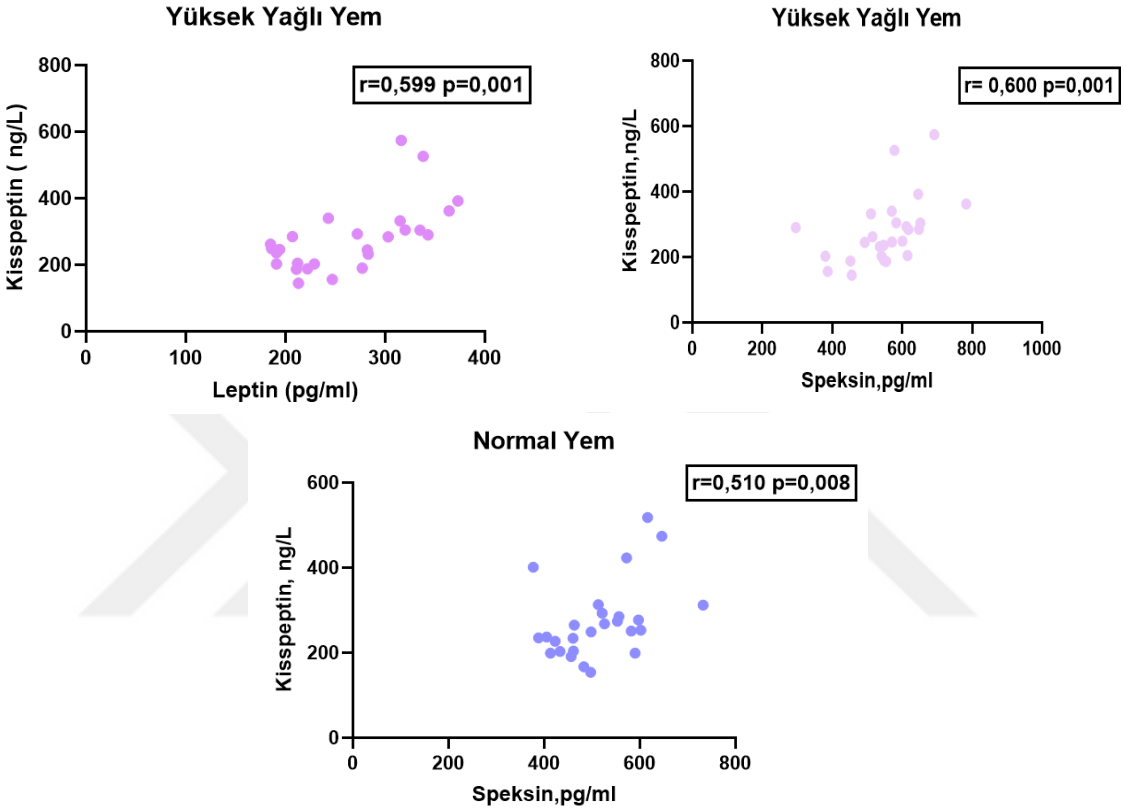
*G1-G2-G3 ile ifade edilen gruplar normal yem ile beslenen grubu, G4-G5-G6 ile ifade edilen gruplar yüksek yağlı yem ile beslenen grubu ifade eder.

**G1 ifadesi prepuberte dönemini (PNG 28), G2 ifadesi puberte dönemini (PNG 42) ve G3 ifadesi postpuberte dönemini (PNG 70) ifade eder.

***G4 ifadesi prepuberte dönemini (PN 28), G5 ifadesi puberte dönemini (PNG 42) ve G6 ifadesi postpuberte dönemini (PNG 70) ifade eder

Serum Spearman (rho) korelasyon analizleri;

- Yüksek yağlı yem grubunda; serum kisspeptin ve leptin pozitif yönde korele bulundu (r=0.599 p=0.001). Serum kisspeptin ve SPX pozitif yönde korele bulundu (r= 0.600 ve p =0.001).
- Normal yem grubunda; serum kisspeptin ve SPX pozitif korele bulundu (r=0.510 p=0.008).



Şekil 22. Spearman (rho) korelasyon analizleri grafi ile ifade edilmektedir.

Aynı Pubertal Dönemde Bulunan Sıçanların Normal ve Yüksek Yağlı Yem ile Beslenme Durumuna göre Sakrifikasyon Ağırlıkları, Δ Ağırlık/İlk Ağırlık Değerleri, Vajinal Açıklık Zamanları ve Serum Hormon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

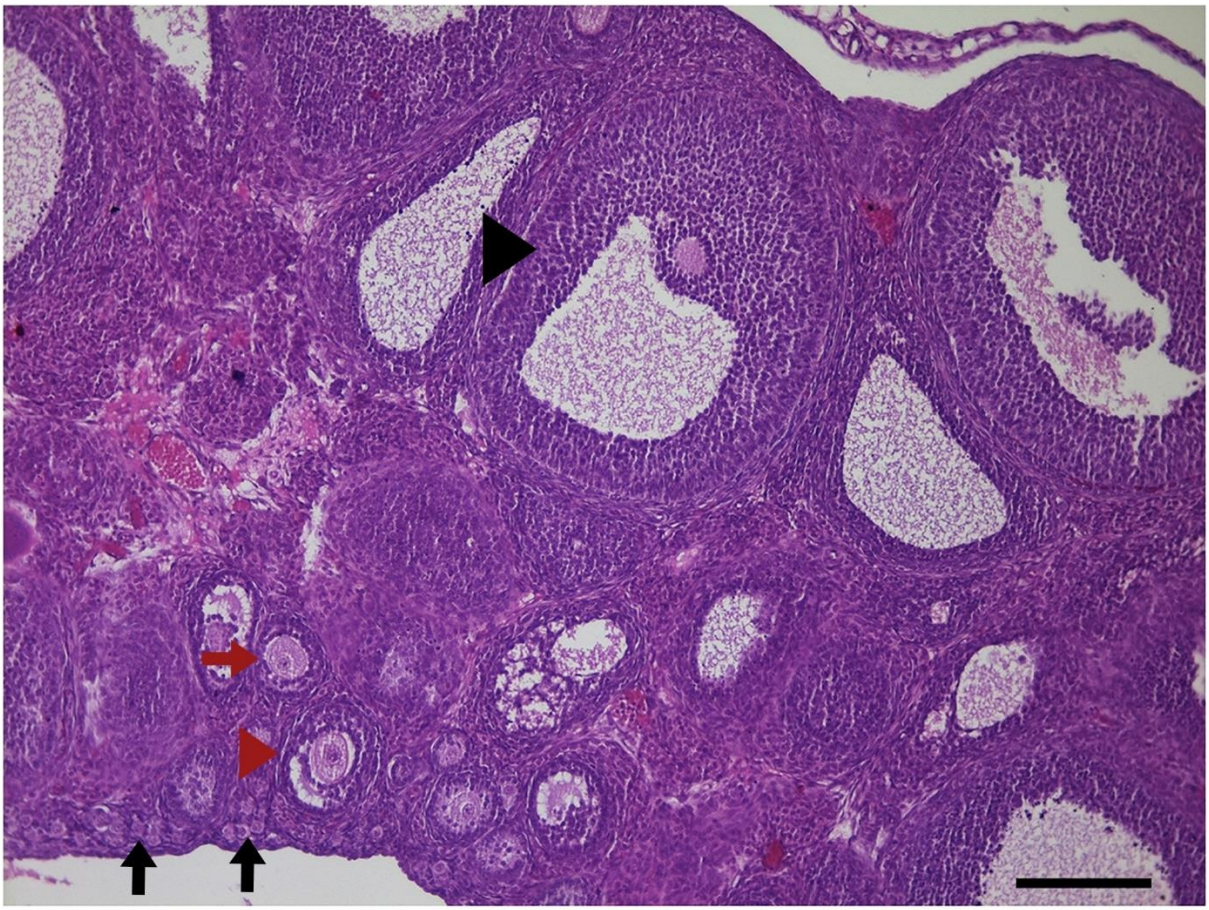
- Sıçanların Δ ağırlık/ilk ağırlık oranları normal yem grubunda yüksek yağlı yem grubuna göre prepuberte ve puberte dönemlerinde anlamlı yüksek bulundu (Tablo 3) (sırasıyla p<0.001 ve p=0.019).
- Sıçanların serum speksin düzeyleri normal yem grubunda yüksek yağlı yem grubuna göre prepuberte döneminde anlamlı düşük bulundu (Tablo 4) (p=0.048).

- Sıçanların serum s-leptin düzeyleri normal yem grubunda yüksek yağlı yem grubuna göre puberte döneminde anlamlı düşük, postpuberte döneminde anlamlı yüksek bulundu (Tablo 4) (sırasıyla p=0.033 ve p=0.01).
- Sıçanların serum östrodiol düzeyleri normal yem grubunda yüksek yağlı yem grubuna göre prepuberte döneminde anlamlı düşük, puberte döneminde anlamlı yüksek bulundu (Tablo 4) (sırasıyla p=0.004 ve p=0.003).

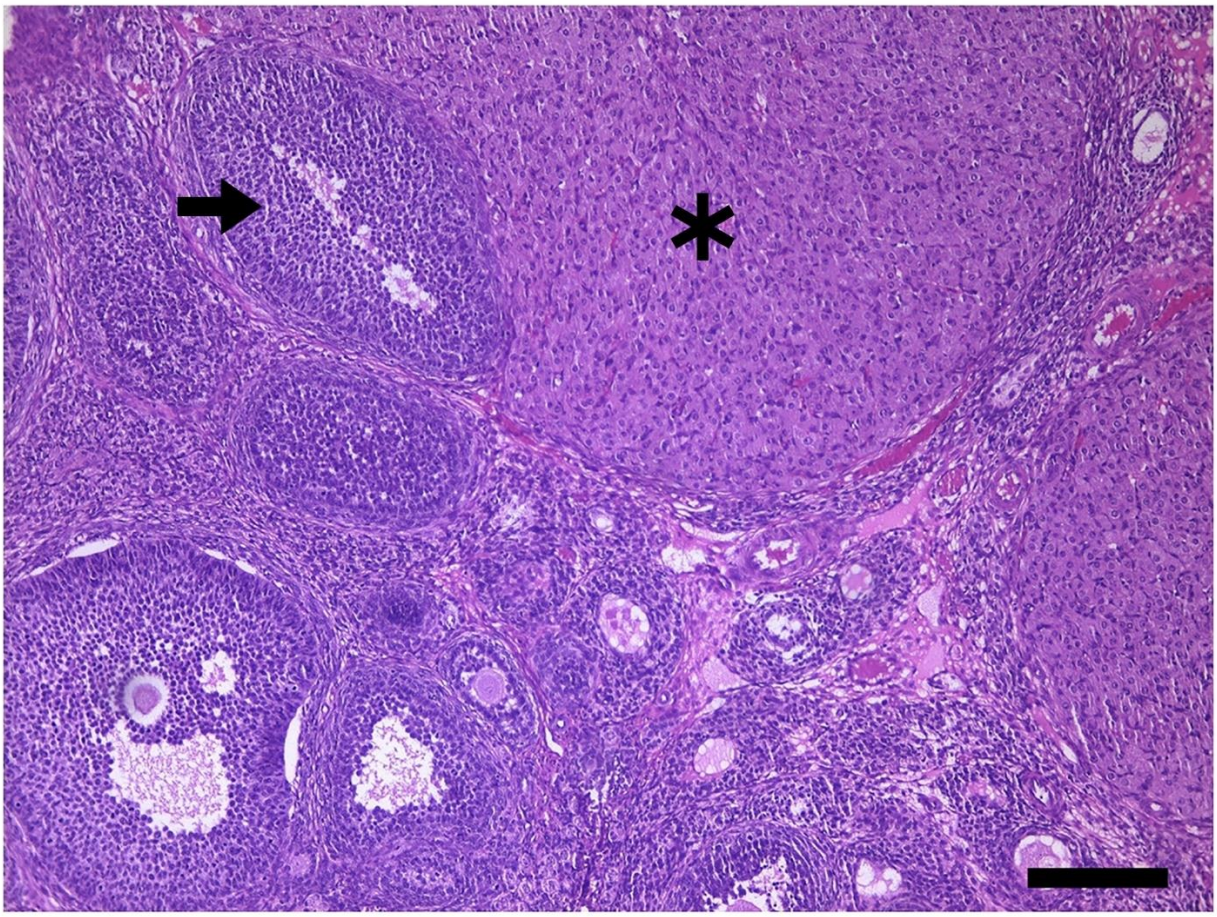
6.2. Hematoksilin- Eozin ile Ovaryum ve Beyaz Yağ Dokusunun Değerlendirilmesi

Prepuberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların (G1) hematoksilin eozin ile boyanan ovaryum dokuları incelendiğinde, tek katlı yassı epitelle çevrili primordiyal folikül; tek katlı kübik epitelle çevrili erken primer folikül; tek katlı prizmatik epitelle çevrili geç primer folikül; antrum sıvı birikimi ile sekonder folikül;kümülüs ooforus ile olgun graaf folikül yapıları izlenmiştir (Şekil 23). Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanın hematoksilin eozin boyanan ovaryum dokusu incelendiğinde korpus luteum ve atretik folikül görülmektedir (Şekil 24).

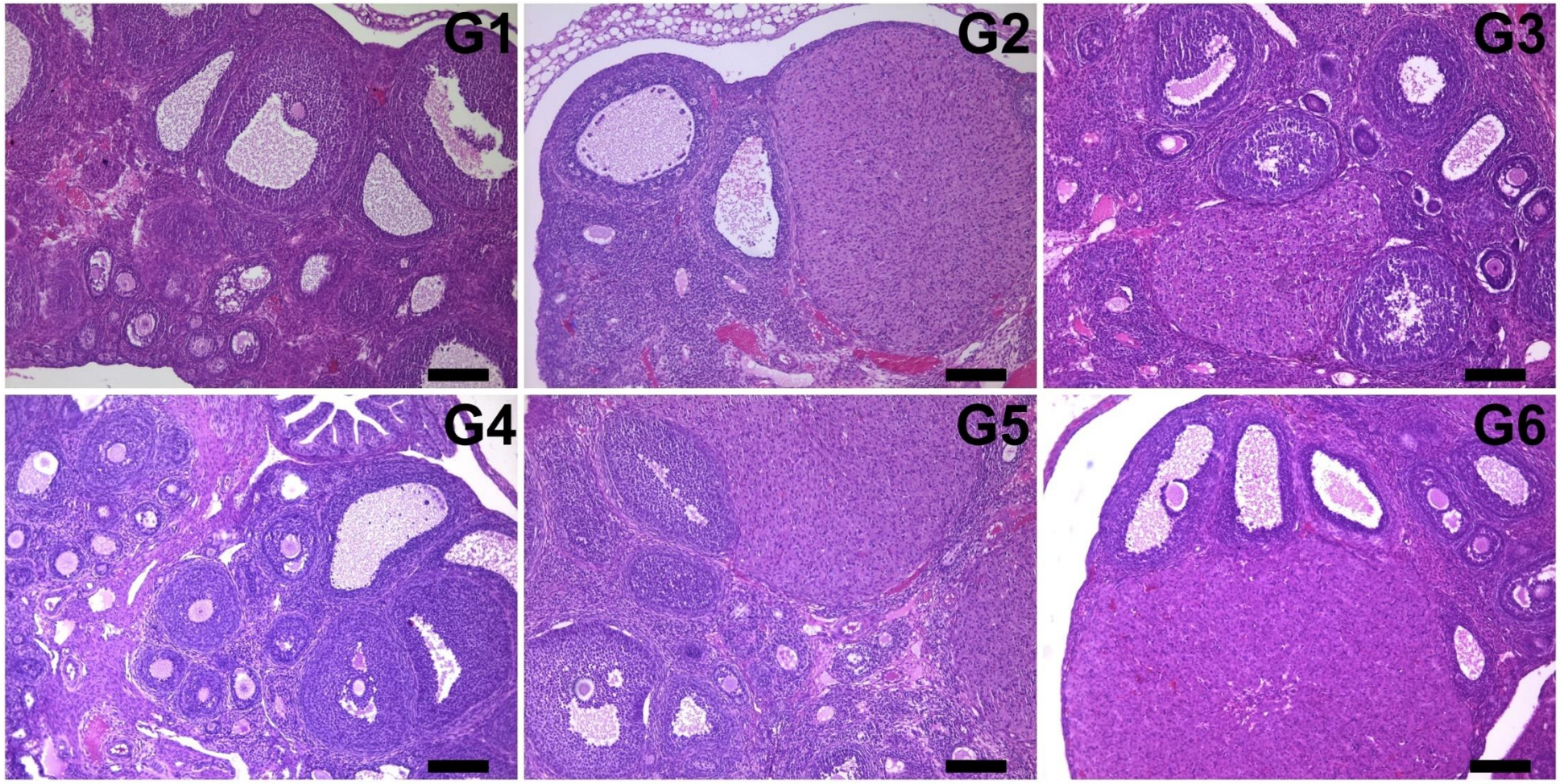
Normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların, ovaryum dokusundan elde edilen örneklerin ışık mikroskobu ile incelenmesinde; prepuberte, puberte ve postpuberte dönemlerinin tümünde primordiyal, primer, sekonder ve Graff folikülleri görülmüş olup, yalnızca puberte ve postpuberte döneminde ovulasyon göstergesi kabul edilen korpus luteum izlenmiştir (Şekil 25).



Şekil 23. Tek katlı yassı folikül hücreleri ile primordiyal folikül (ok), tek katlı kübik veya prizmatik folikül hücreleri ile primer folikül (kırmızı ok), antrum sıvı birikimi ile (kırmızı ok başı) sekonder folikül ve (siyah ok başı) kümülüs ooforus ile olgun graaf folikül izlenmektedir. Hematoksilin Eozin, x10 objektif, Bar: 200 µm.



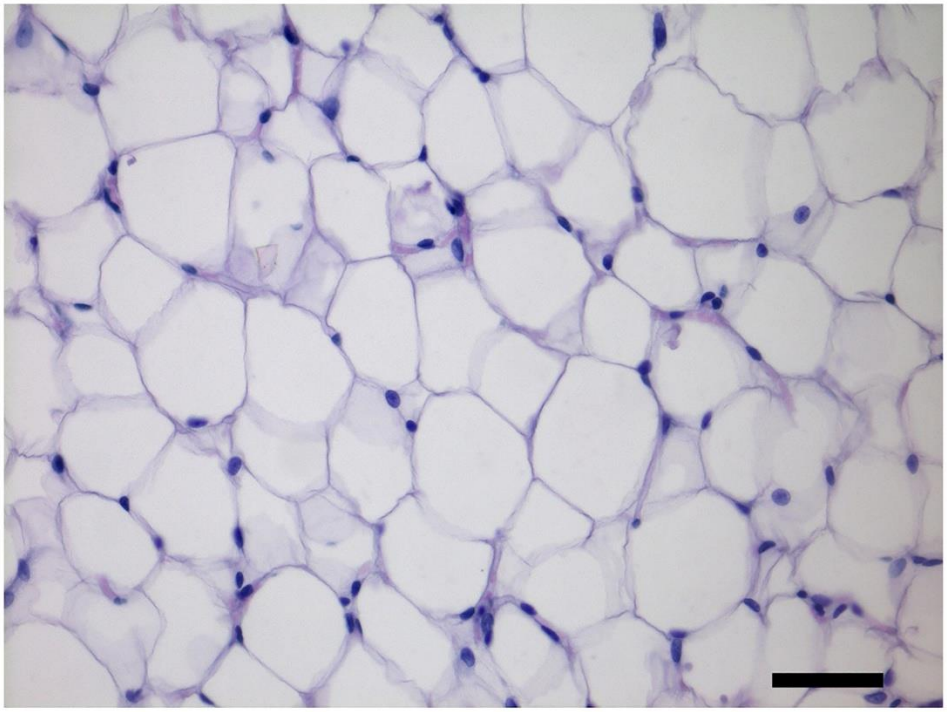
Şekil 24. Puberte dönemine ait normal yem ile beslenen sıçandan elde edilen ovaryum dokusunda korpus luteum (asteriks) ve atretik folikül (ok) izlenmektedir. Hematoksilin Eozin, X10 objektif, Bar: 200 µm.



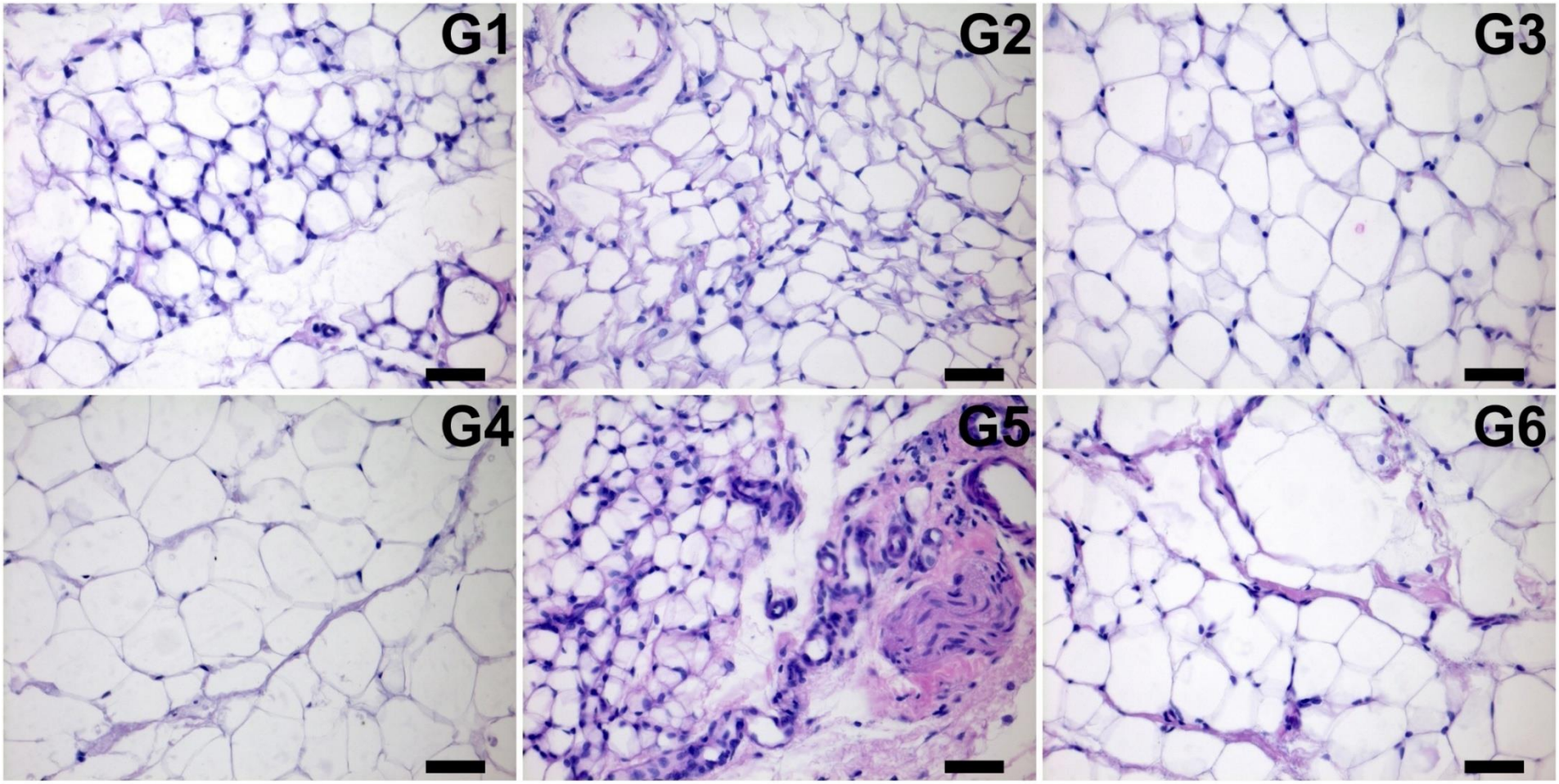
Şekil 25. Deney gruplarından elde edilmiş ovaryum dokusuna ait mikrograflar izlenmektedir. Hematoksilin- Eozin, x10 objektif. Bar: 200 µm.

Postpuberte dönemi normal yem ile beslenen gruba ait beyaz yağ dokusunda, adipositler uniloküler lipid damlacığı ile dolu görülmektedir. Adiposit çekirdeğinin hücre kenarına itilmiş olduğu ve taşlı yüzük görüntüsü oluşturduğu izlenmiştir (Şekil 26).

Normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların, beyaz yağ dokusundan elde edilen örneklerin ışık mikroskobu ile incelenmesinde; histomorfolojik olarak aynı döneme ait gruplar arasında belirgin fark izlenmemiştir (Şekil 27).



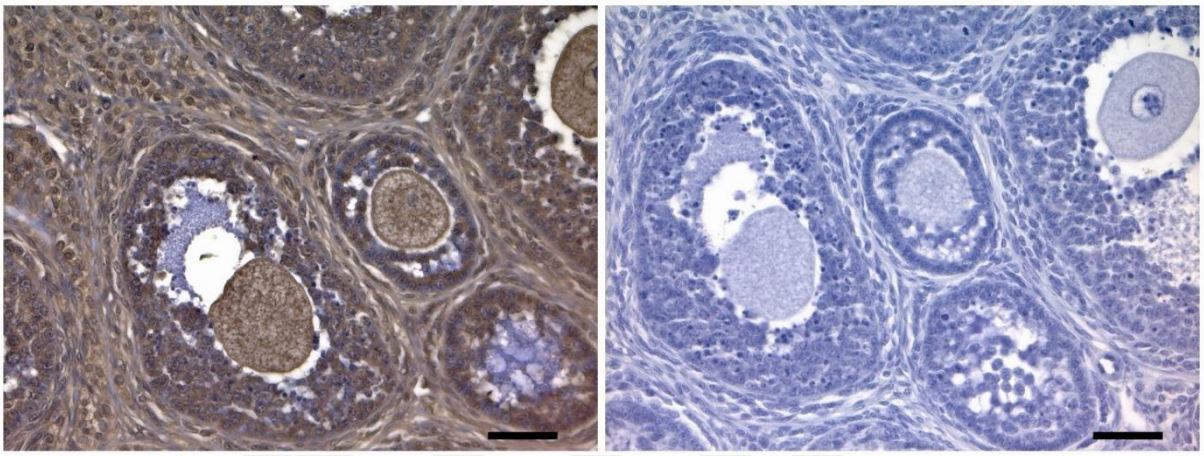
Şekil 26. Postpuberte dönemine ait normal yem ile beslenen sıçanlardan elde edilen subkutan beyaz yağ dokusu kesiti izlenmektedir, Hematoksilin Eozin, X40 objektif, Bar: 50 µm.



Şekil 27. Deney gruplarından elde edilmiş beyaz yağ dokusuna ait mikrograflar izlenmektedir, Hematoksilin Eozin, X40 objektif, Bar: 50 µm.

6.3. İmmunhistokimya için Boyama Değerlendirmesi

Deney gruplarından alınan ovaryum ve beyaz yağ dokusu örnekleri, SPX primer antikoru ile immunhistokimya yöntemle boyandı. DAB ile renklenlendirildi. Kahverengi boyanma pozitif olarak değerlendirildi. Her bir örnek pozitif ve negatif boyanma yapılarak sağlama gerçekleştirildi (Şekil 28 ve 44).



SPX(+) immunboyama ifadelenmesi SPX(-) immunboyama ifadelenmesi

Şekil 28. Ovaryum dokusuna ait SPX pozitif ve negatif immünboyama ifadesine ait mikrograflar izlenmektedir, X40 objektif, Bar: 50 µm.

6.3.1. Ovaryum Dokuısu pozitif SPX immunboyama ifadelenmesi

Ovaryum granüloza hücreleri teka hücrelerine kıyasla daha fazla SPX boyanma özelliği göstermektedir (Şekil 29).

Prepuberte dönemi, normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda (G1) SPX pozitifliği geç primer folikülde ovosit sitoplazmasında, granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde; primordiyal folikülde, ovosit sitoplazması, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde izlenmektedir (Şekil 29, 30 ve 31).

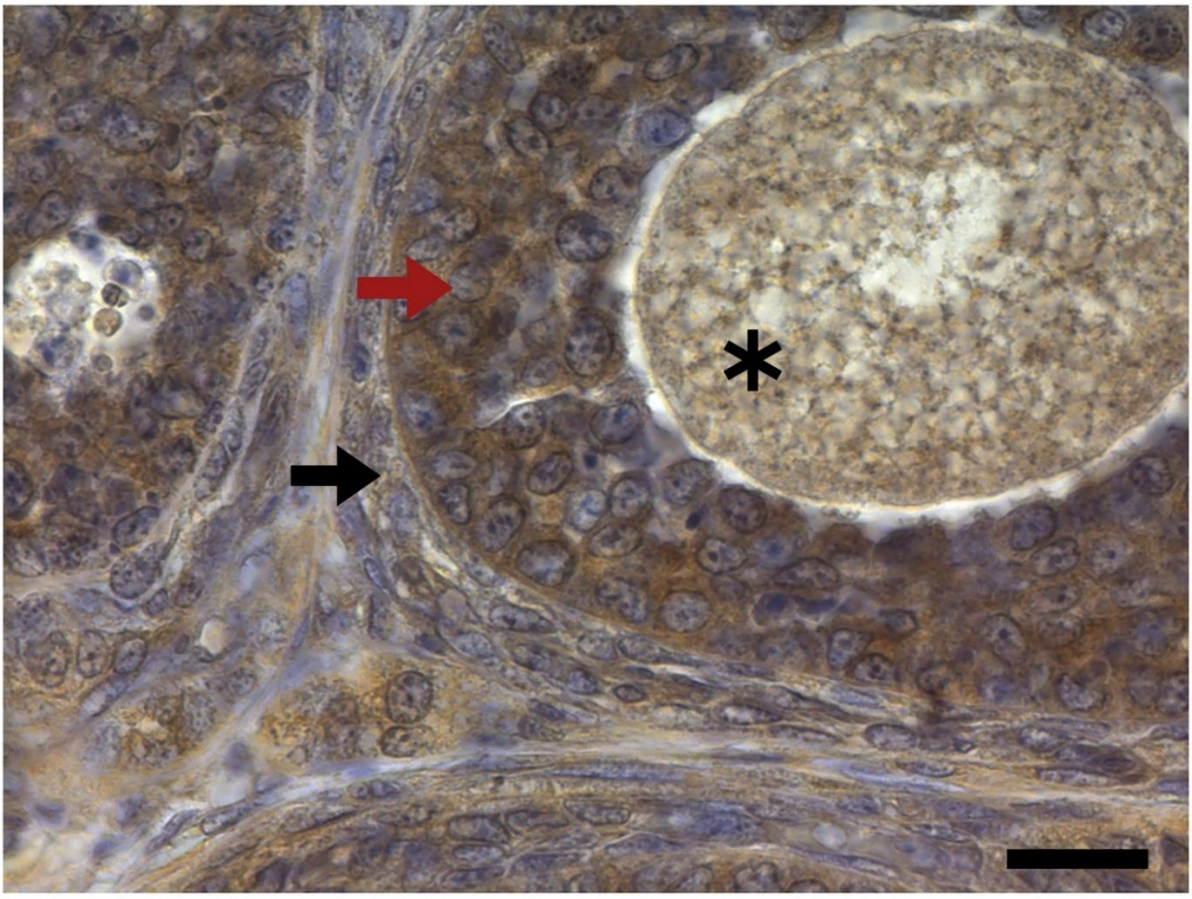
Puberte dönemi normal yem ile beslenen grupta ovaryum dokusu (G2), erken primer folikül, geç primer folikülün granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde ve korpus luteum, granüloza lutein hücresi SPX (+)' liği görülmektedir (Şekil 32, 33 ve 34).

Postpuberte dönemi, normal yem ile beslenen gruba (G3) ait ovaryum dokusunda SPX pozitifliği erken primer folikül, geç primer folikül granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde izlenmektedir (Şekil 35 ve 36).

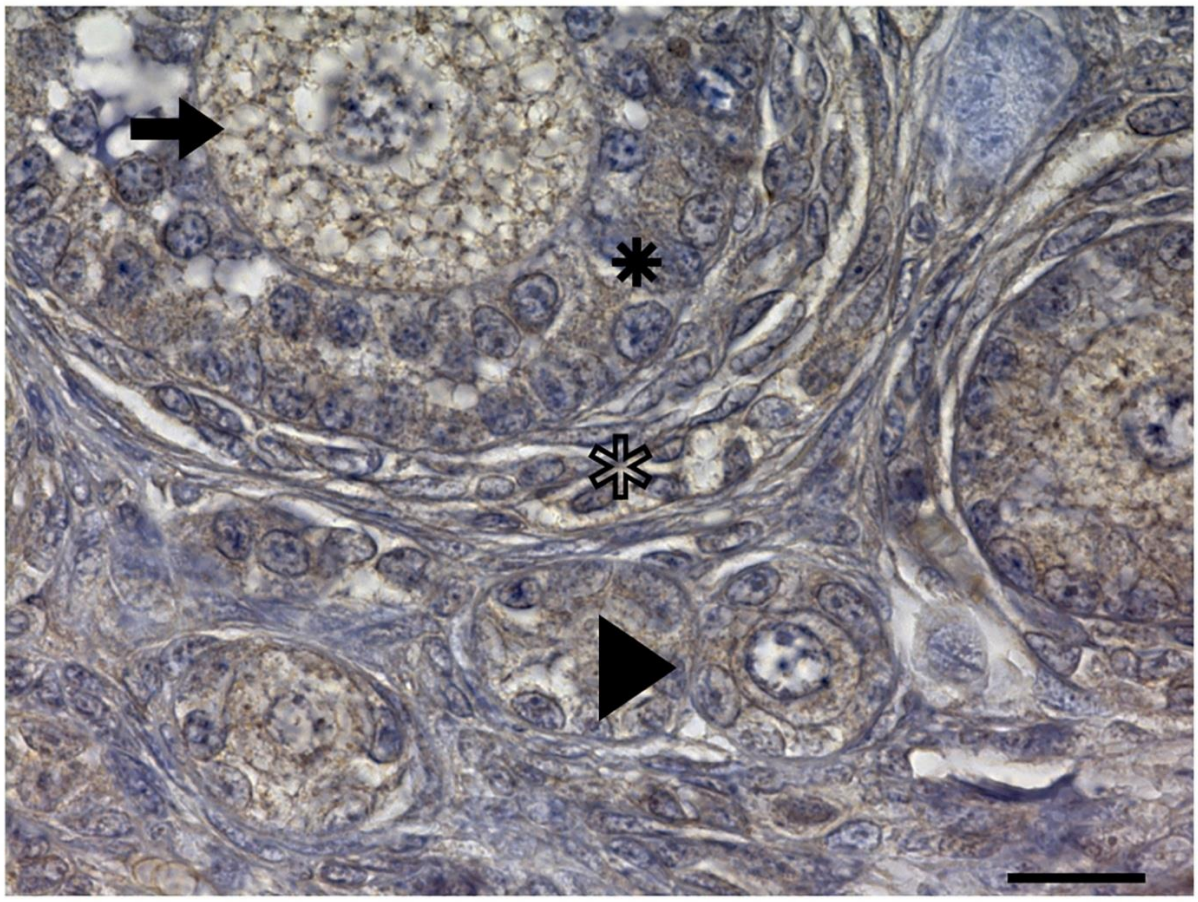
Prepuberte dönemi, yüksek yağlı yem grubunda (G4) SPX (+) primordiyal folikül ile erken primer folikül görülmektedir (Şekil 37 ve 38).

Puberte dönemi, yüksek yağlı yem gruba (G5) ait ovaryum dokusunda SPX pozitifliği erken primer folikül, ovosit, primordiyal folikül ve granüloza hücreleri ile teka hücrelerinde izlenmektedir (Şekil 39 ve 40).

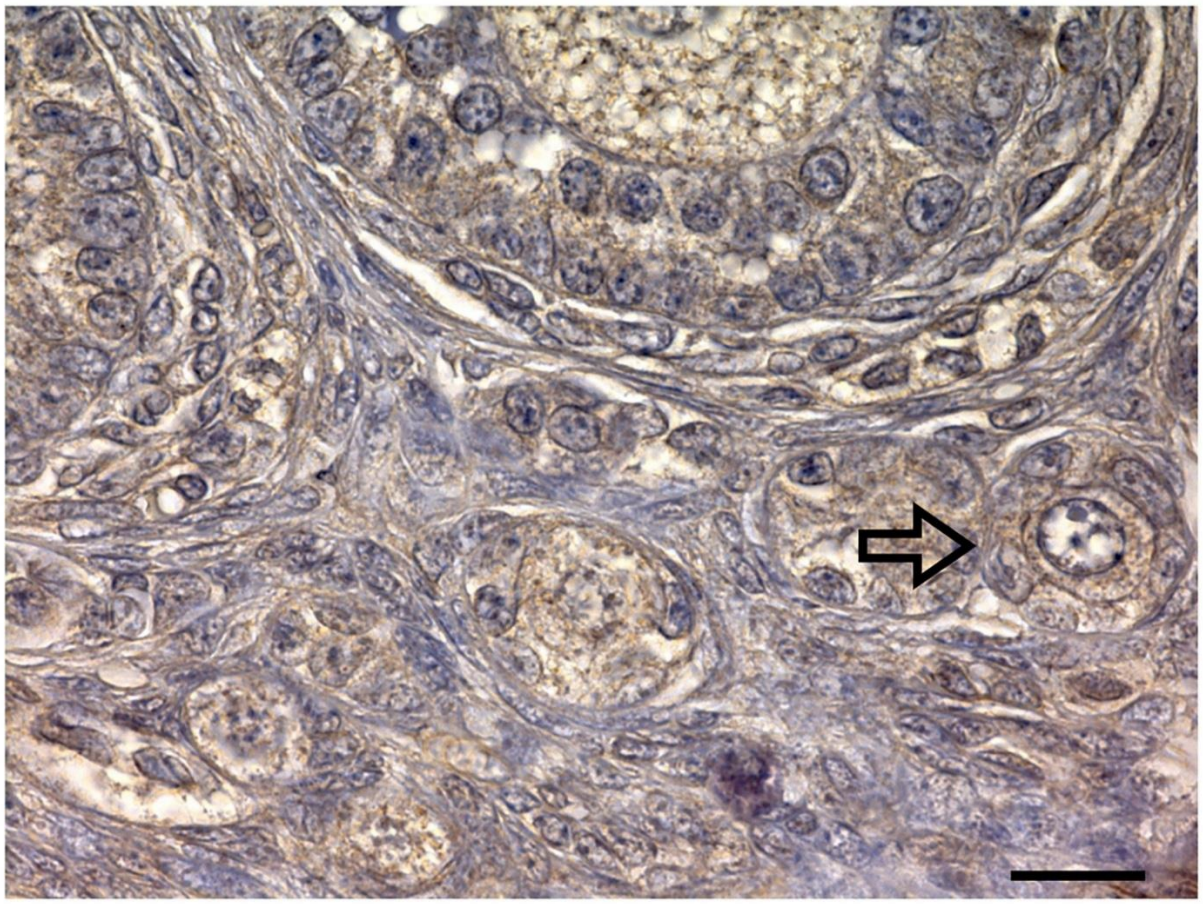
Postpuberte dönemi, yüksek yağlı yem grubunda (G6) sekonder folikülde SPX (+) ovosit sitoplazması, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde ve korpus luteumda granüloza lutein hücresi ve lipit damlacıkları görülmektedir (Şekil 41 ve 42).



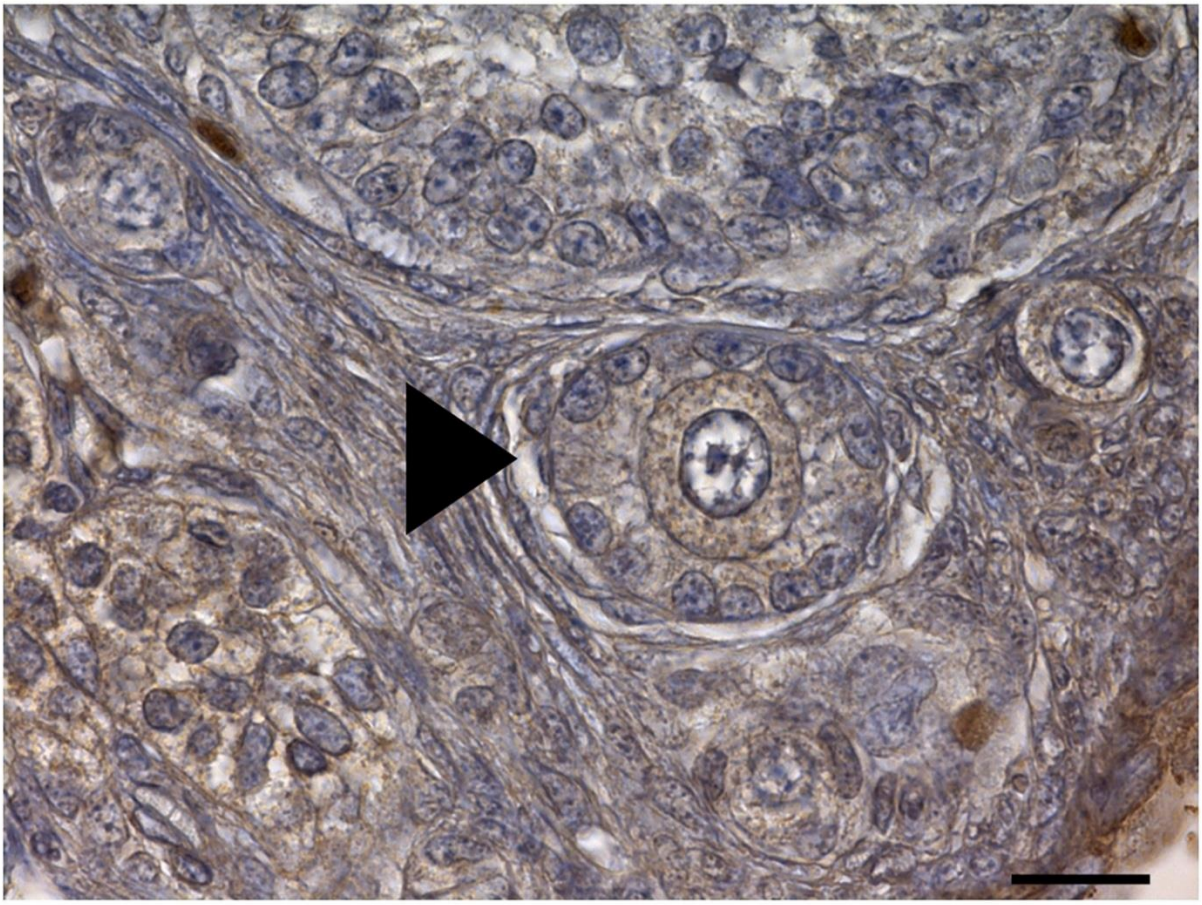
Şekil 29. Prepuberte dönemi, normal yem ile beslenen gruba ait SPX pozitifliği kahverengi boyanma şeklinde geç primer folikülde ovosit sitoplazmasında (asteriks), granüloza hücreleri (kırmızı ok) ve teka hücrelerinde (siyah ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



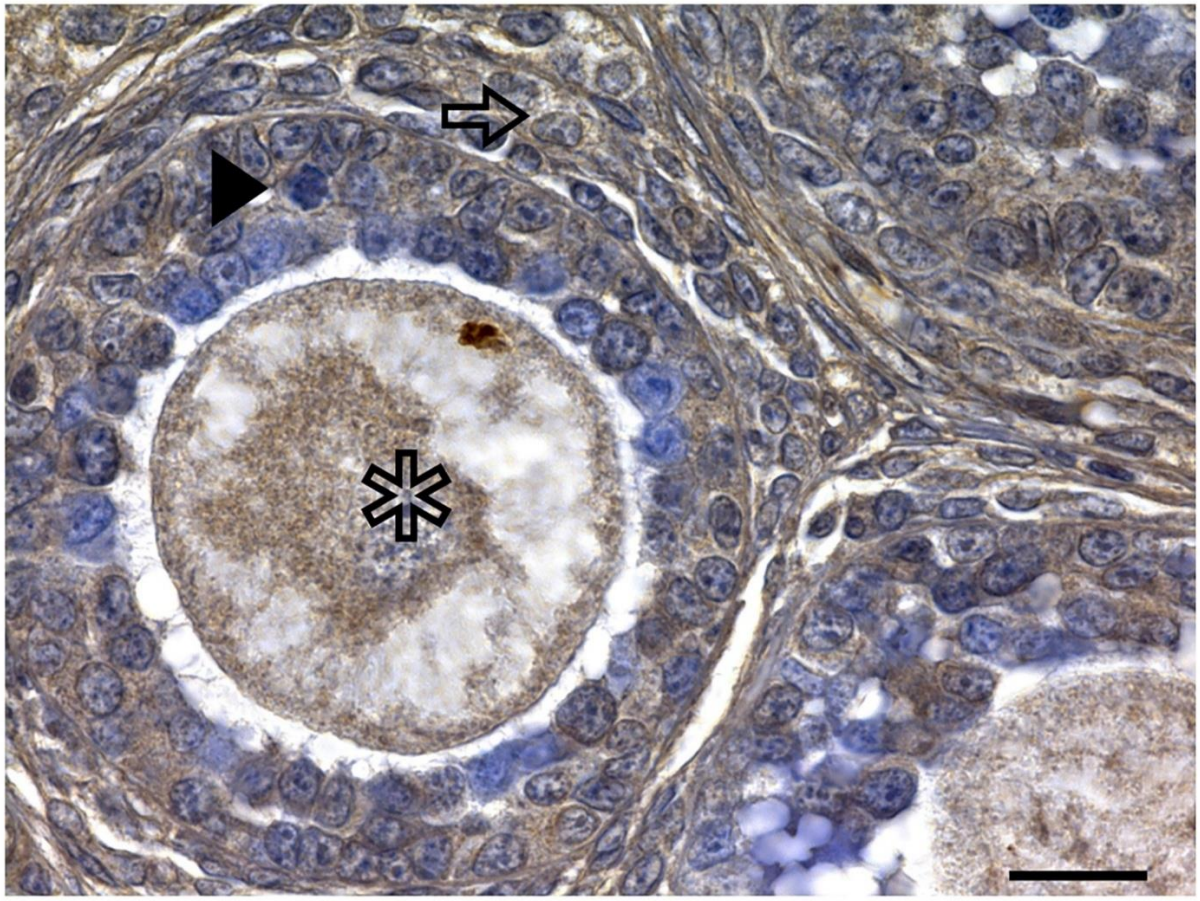
Şekil 30. Prepuberte normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (ok başı), ovosit sitoplazması(ok), granüloza hücreleri (içi dolu asteriks) ve teka hücreleri (içi boş asteriks) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



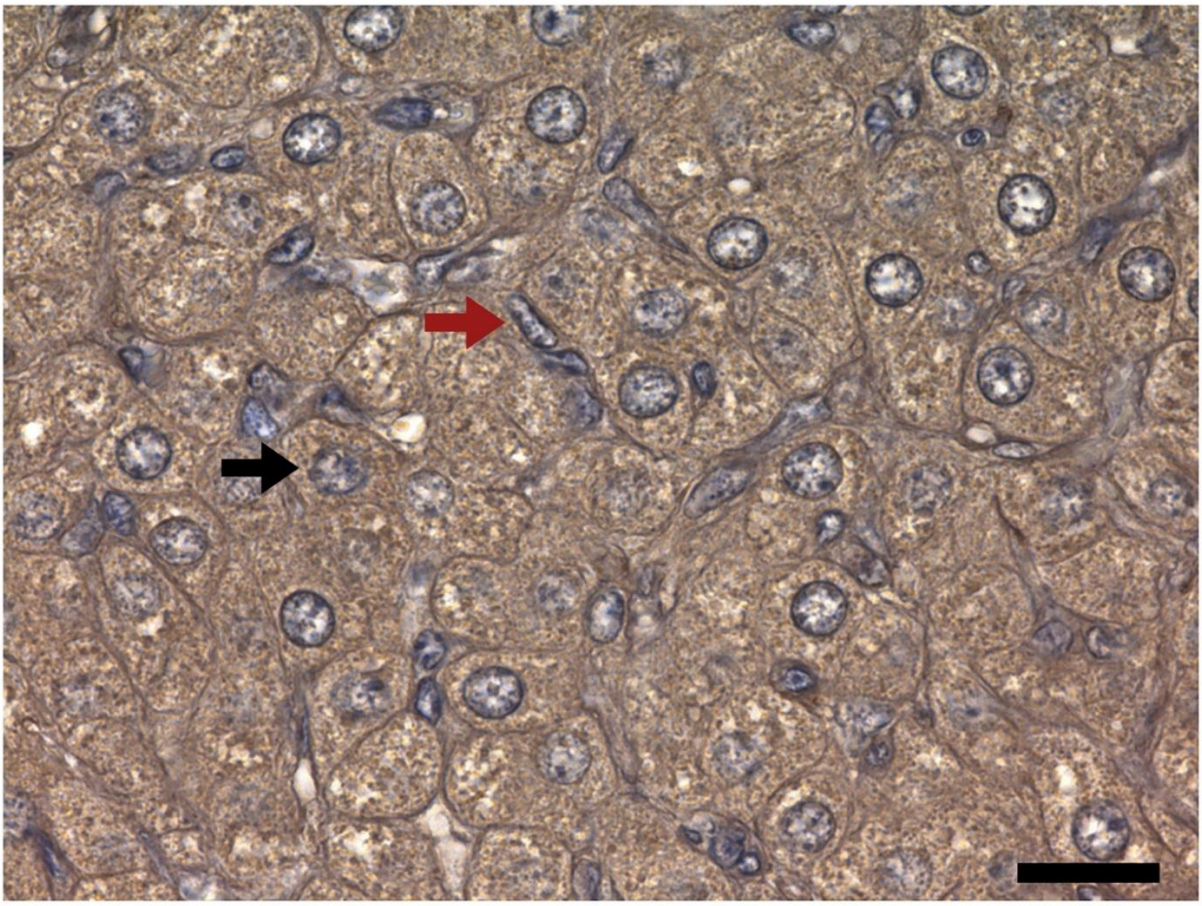
Şekil 31. Prepuberte normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



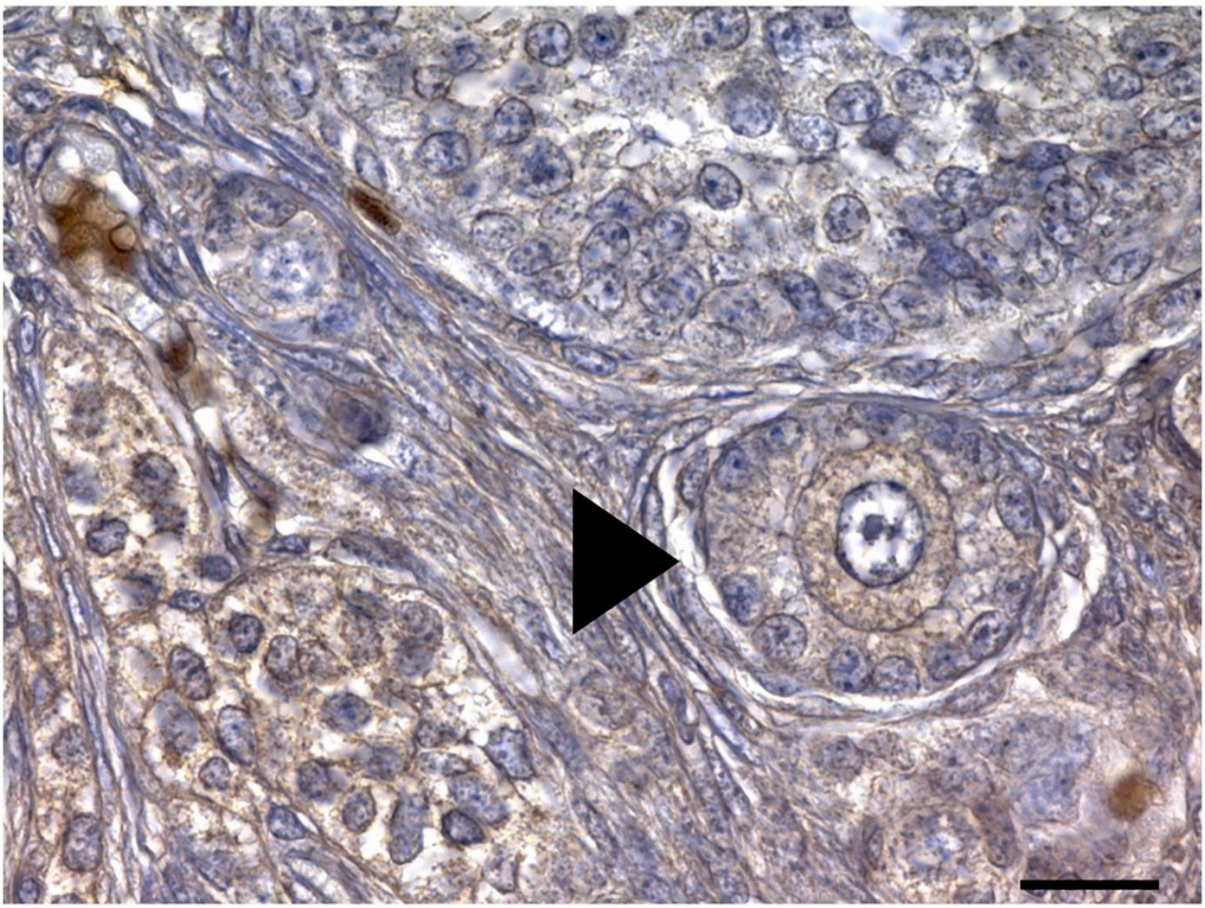
Şekil 32. Puberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) erken primer folikül (ok başı) ile gösterilmiştir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



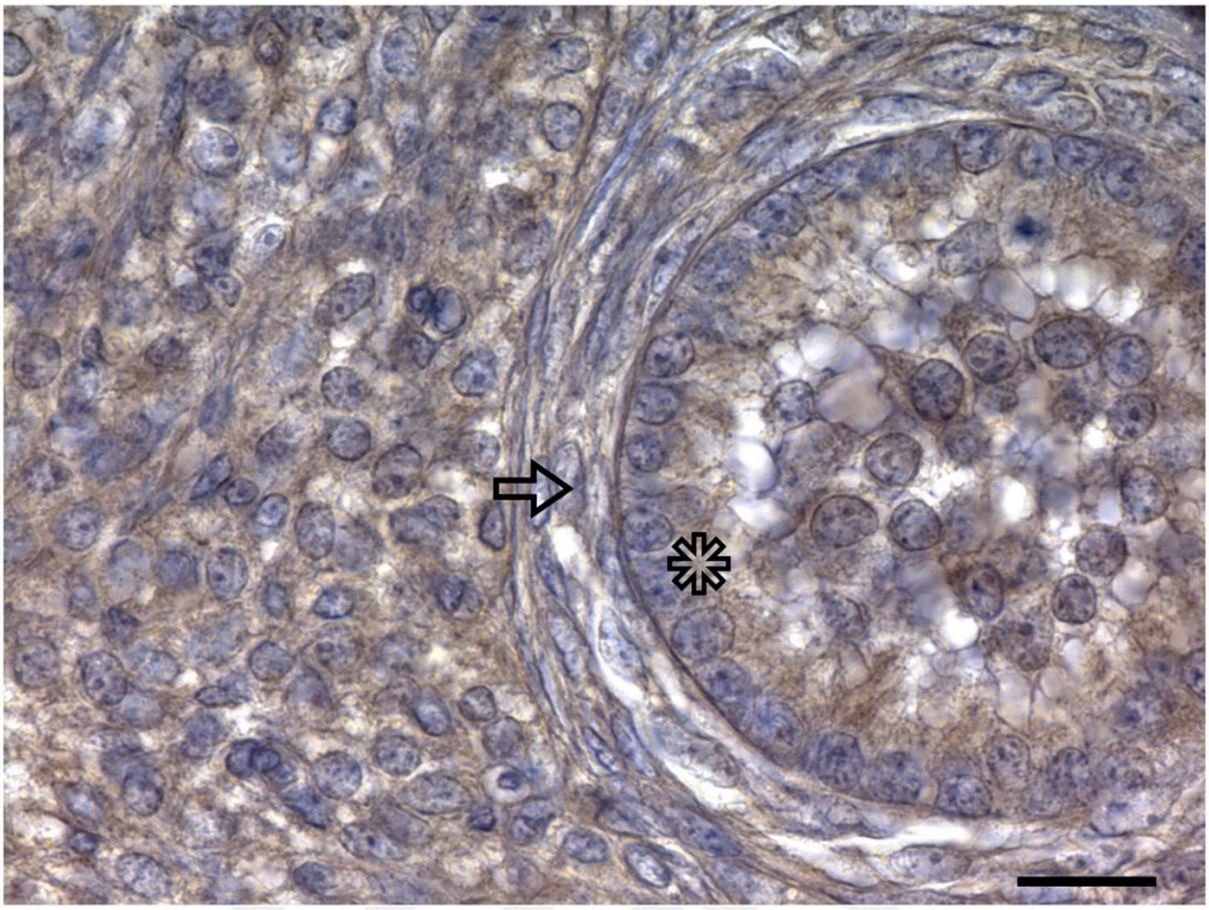
Şekil 33. Puberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) geç primer folikül granüloza hücreleri (ok başı), teka hücreleri (içi boş ok) ve ovosit (içi boş asteriks) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



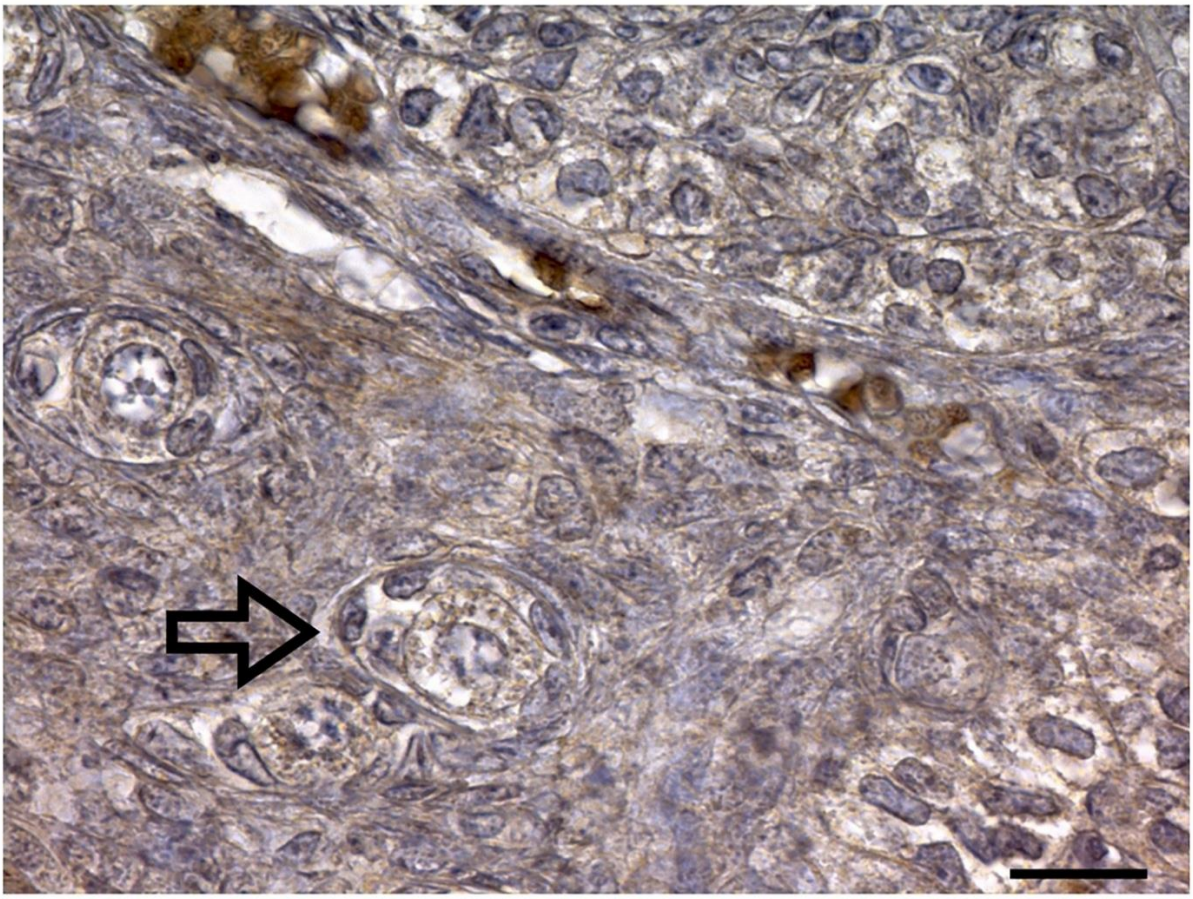
Şekil 34. Puberte dönemi, normal yem ile beslenen gruba ait ovaryum dokusunda, SPX (+) korpus luteumda granüloza lutein hücresi (siyah ok) ve fibrosit (kırmızı ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



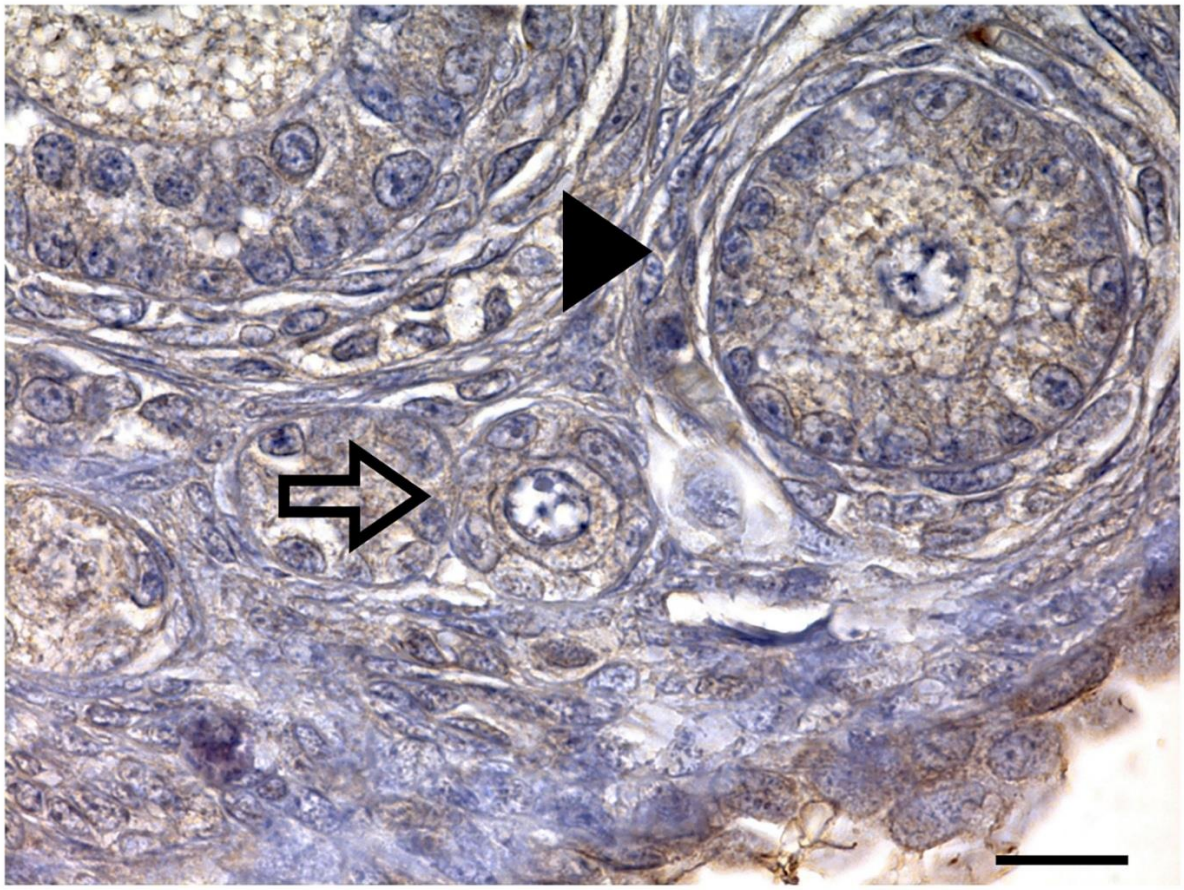
Şekil 35. Postpuberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) erken primer folikül (ok başı) ile gösterilmiştir, X100 objektif, Bar: 20 μm.



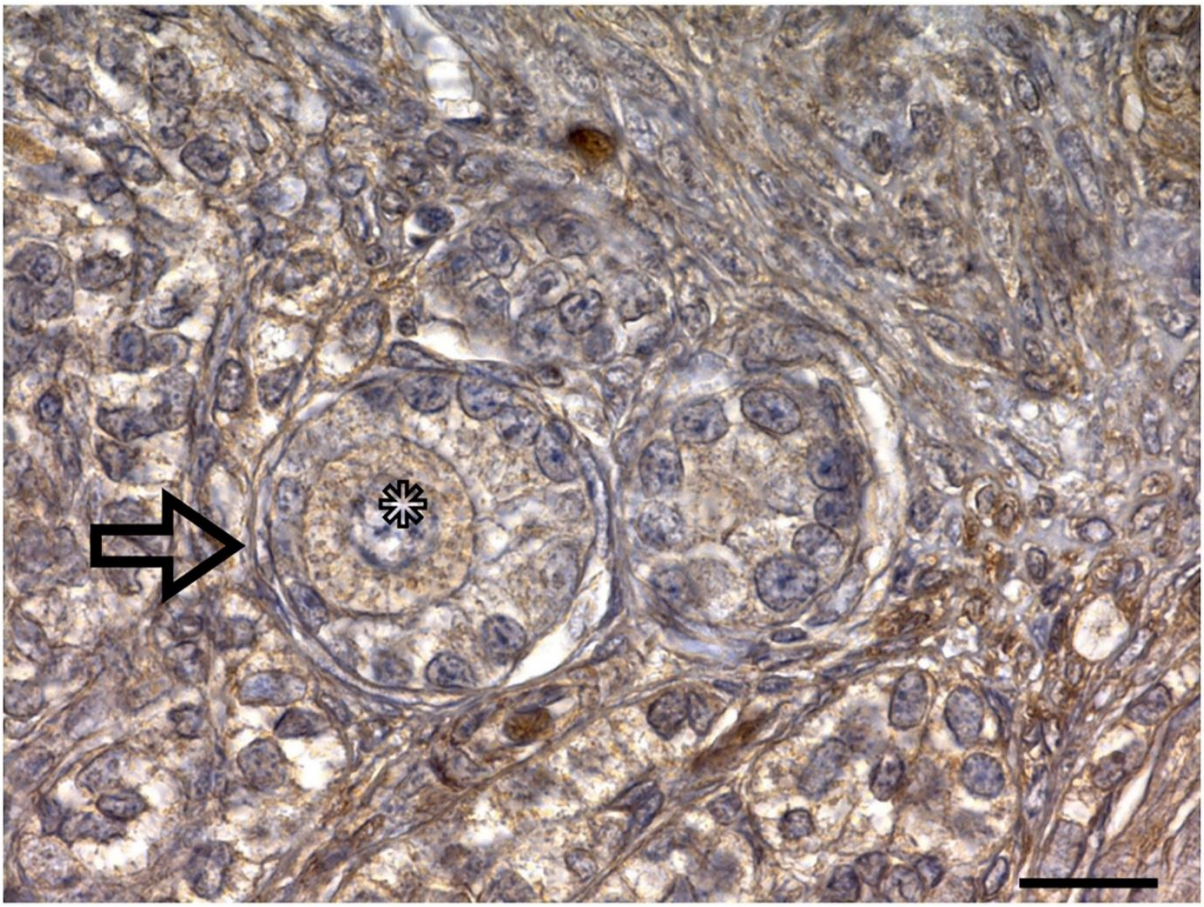
Şekil 36. Postpuberte normal yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) geç primer folikül granüloza hücreleri (boş asteriks) ve teka hücreleri (içi boş ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 μm.



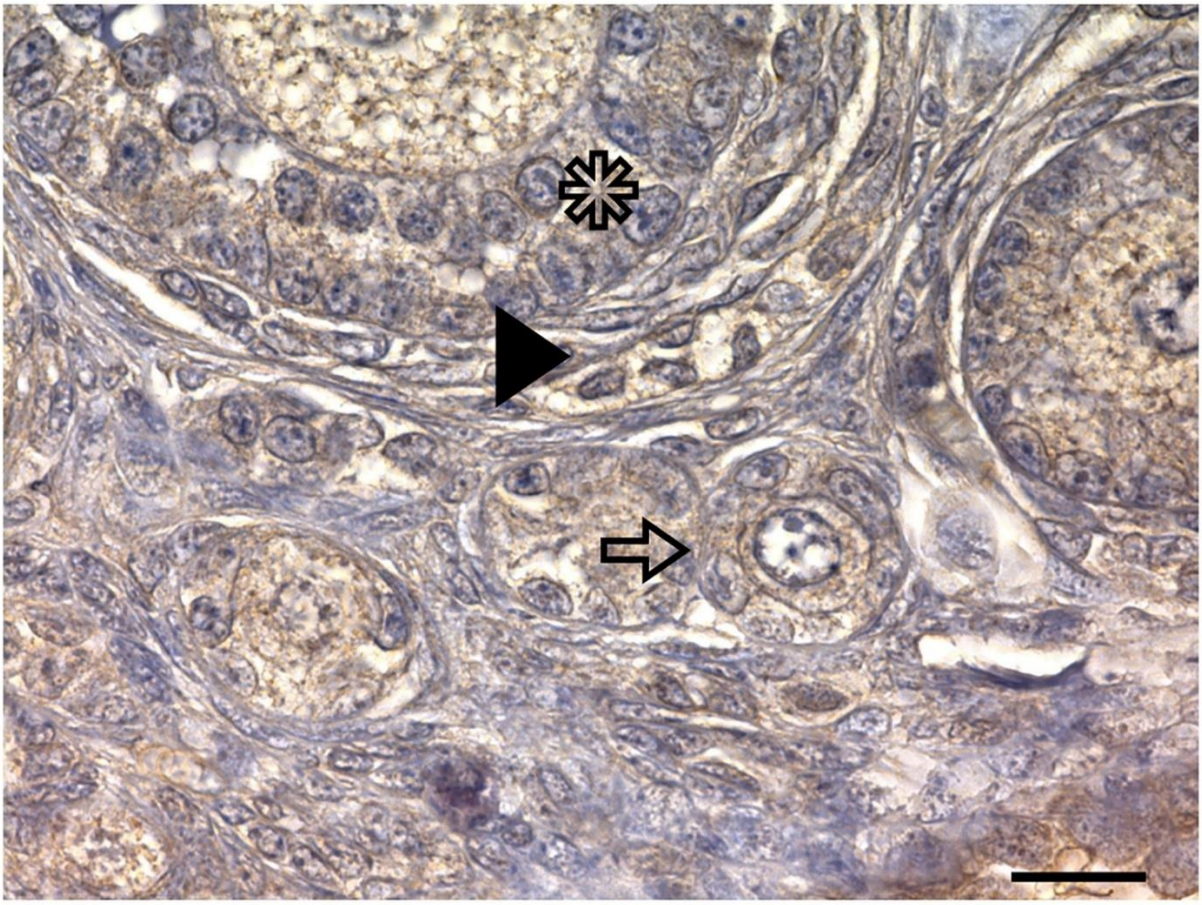
Şekil 37. Prepuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20µm.



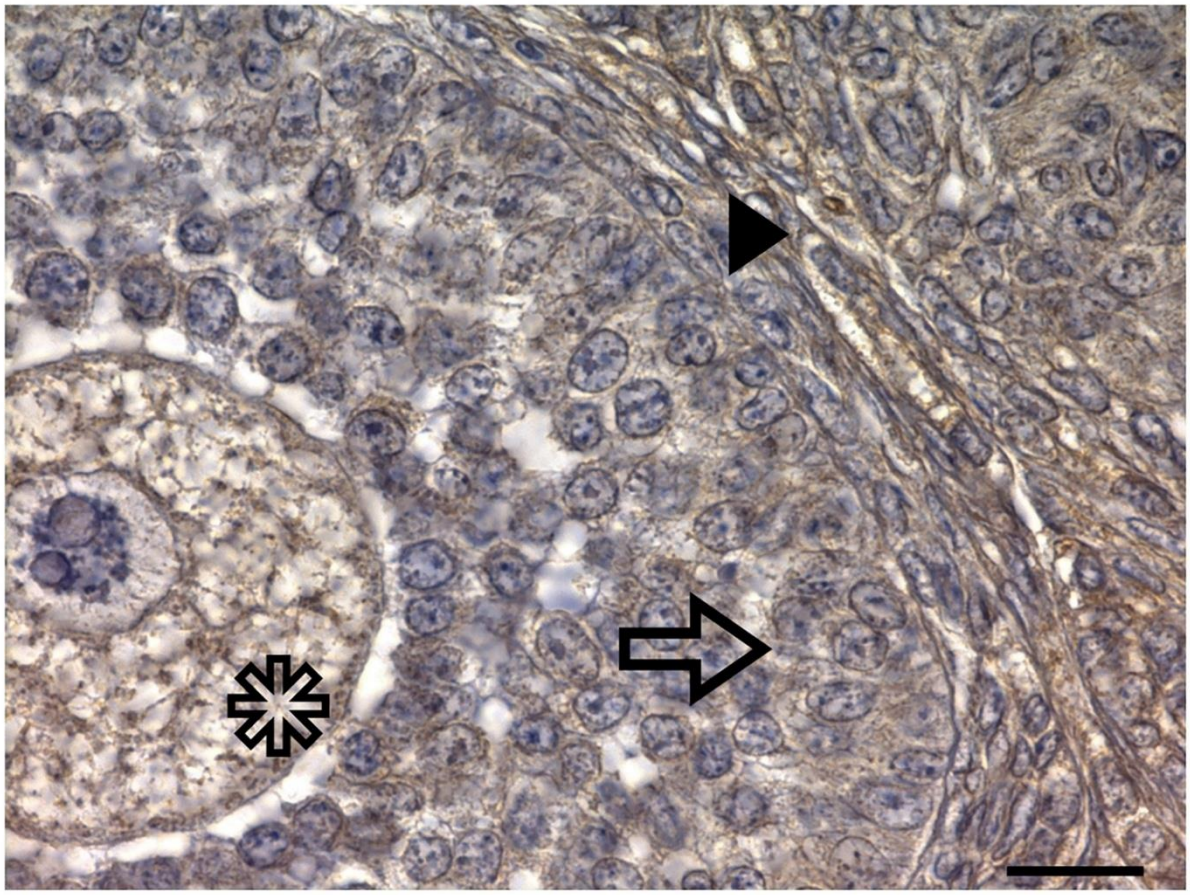
Şekil 38. Prepuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok) ile erken primer folikül (ok başı) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20µm.



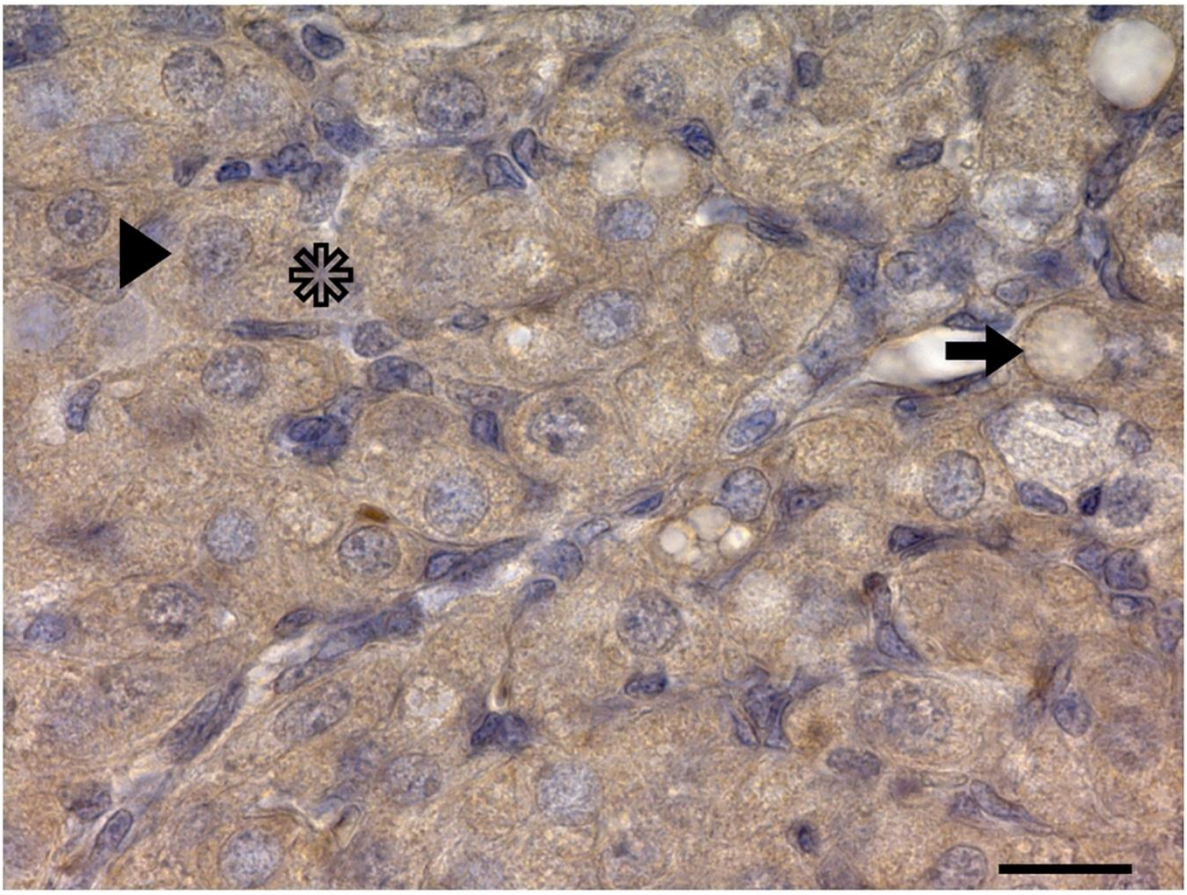
Şekil 39. Puberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) erken primer folikül (içi boş ok) ve ovosit (içi boş asteriks) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.



Şekil 40. Puberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) primordiyal folikül (içi boş ok), granüloza hücreleri (içi boş asteriks) ve teka hücreleri (ok başı) mikrografı izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 μm.

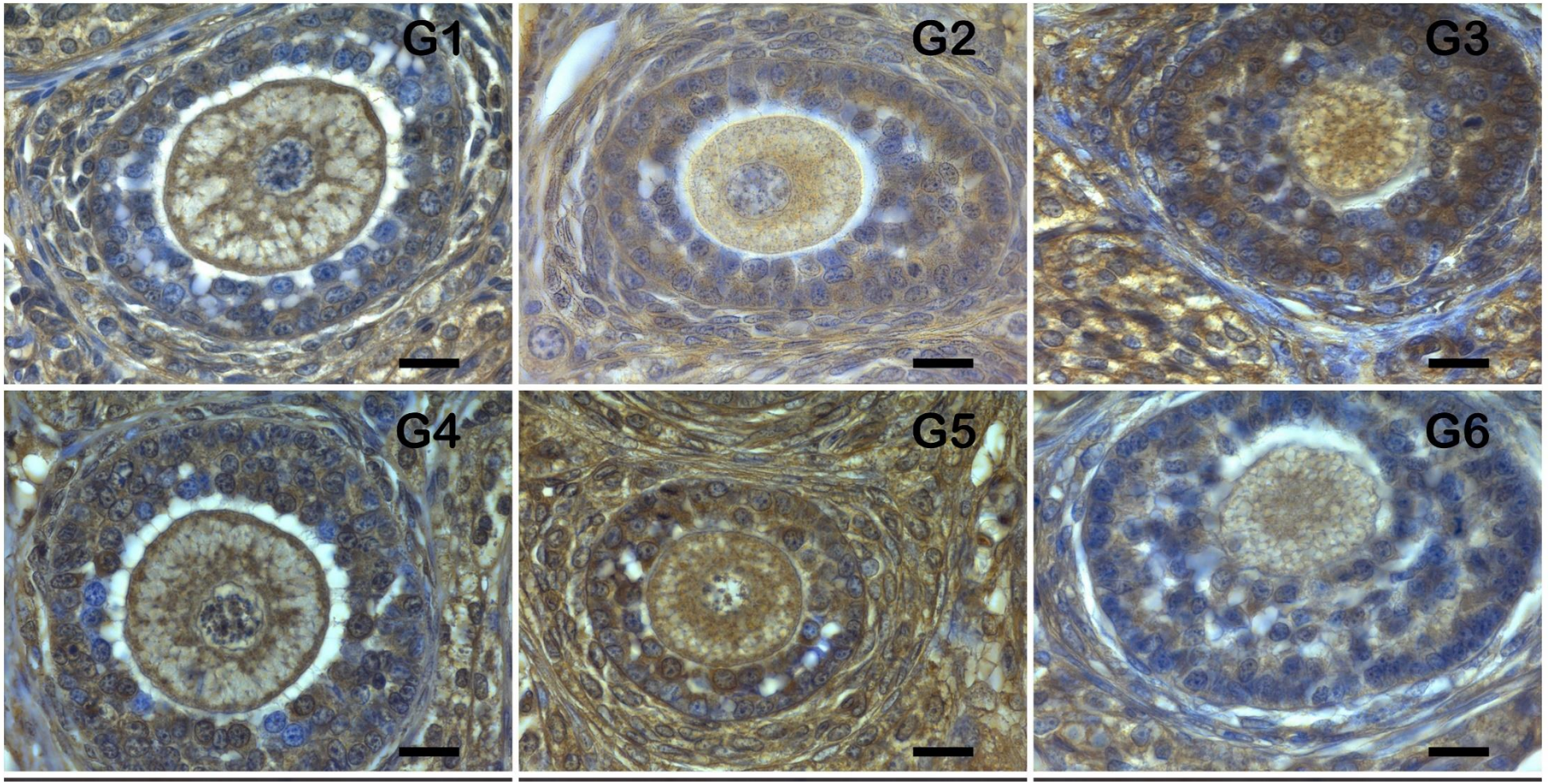


Şekil 41. Postpuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) sekonder folikülde ovosit sitoplazması (içi boş asteriks), granüloza hücreleri (içi boş ok) ve teka hücreleri (ok başı) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 μm.



Şekil 42. Postpuberte yüksek yağlı yem grubuna ait ovaryum dokusunda SPX (+) korpus luteumda granüloza lutein hücresi (ok başı) ve fibrosit (içi boş asteriks) ve lipit damlacıkları (ok) izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.

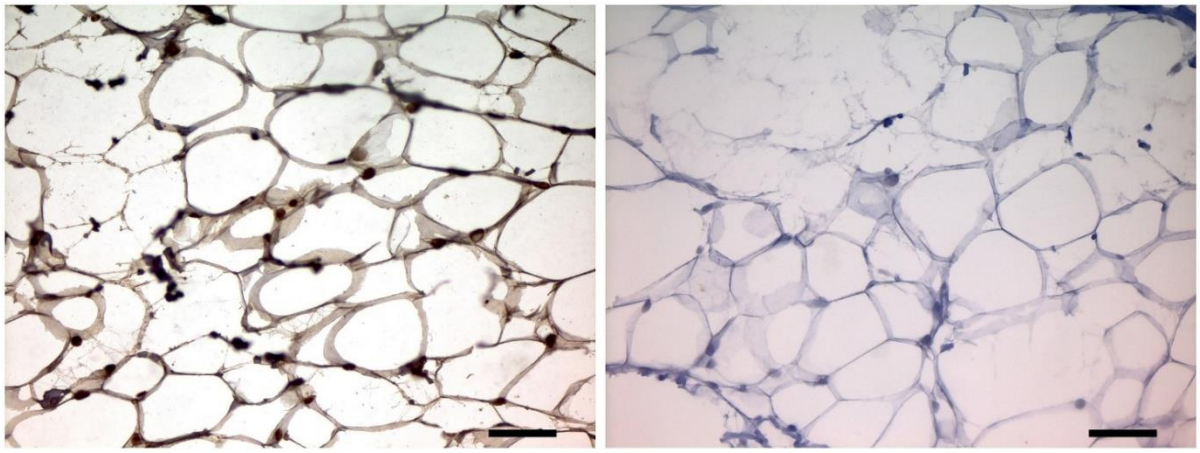
Geç primer folikül SPX (+) immunifadesi normal yem grubunda prepuberteden puberte dönemine geçişte azalıp postpuberte döneminde artmıştır. Yüksek yağlı yem ile beslenen grupta puberte döneminde immunifadesi diğer dönemlere göre yüksektir (Şekil 43, 46).



Şekil 43. Deney gruplarından elde edilmiş ovaryum dokusu geç primer foliküllerin SPX (+) immunifadelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.

6.3.2. Beyaz Yağ Dokusu Pozitif ve Negatif SPX İmmunboyama İfadelenmesi

Beyaz yağ dokusunda SPX boyanmanın pozitif ve negatif kontrolu gösterilmiştir (Şekil 44).

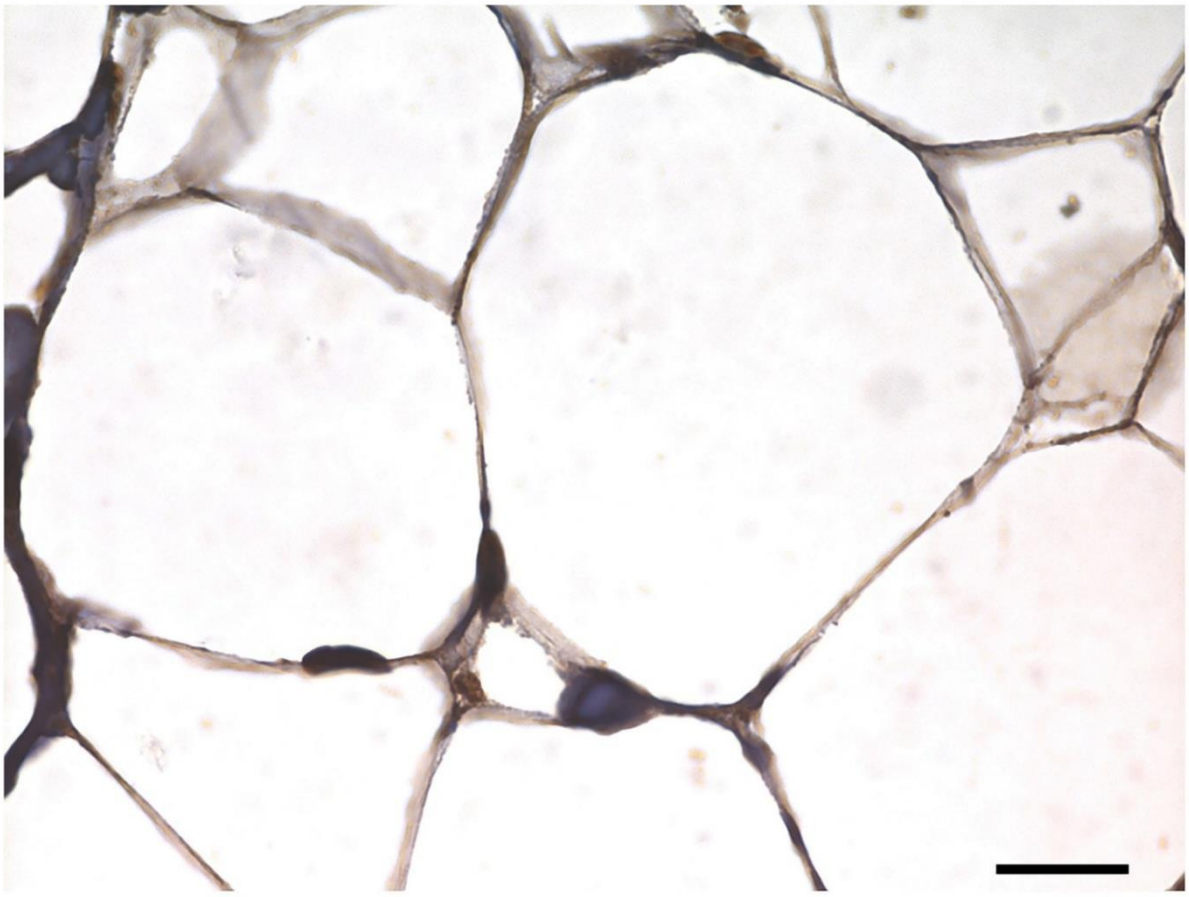


SPX (+) immunboyama ifadelenmesi SPX (-) immunboyama ifadelenmesi

Şekil 44. Beyaz yağ dokusuna ait SPX pozitif ve negatif immünboyama ifadesine ait mikrograflar izlenmektedir, X40 objektif, Bar: 50 µm.

6.3.3. Beyaz Yağ Dokuısu Pozitif SPX İmmunboyama İfadelenmesi

SPX immunifadelenmesine bakıldığında, beyaz yağ dokusu sitoplazmasında ve yassı yağ hücresi çekirdeklerinde izlenmektedir (Şekil 45).

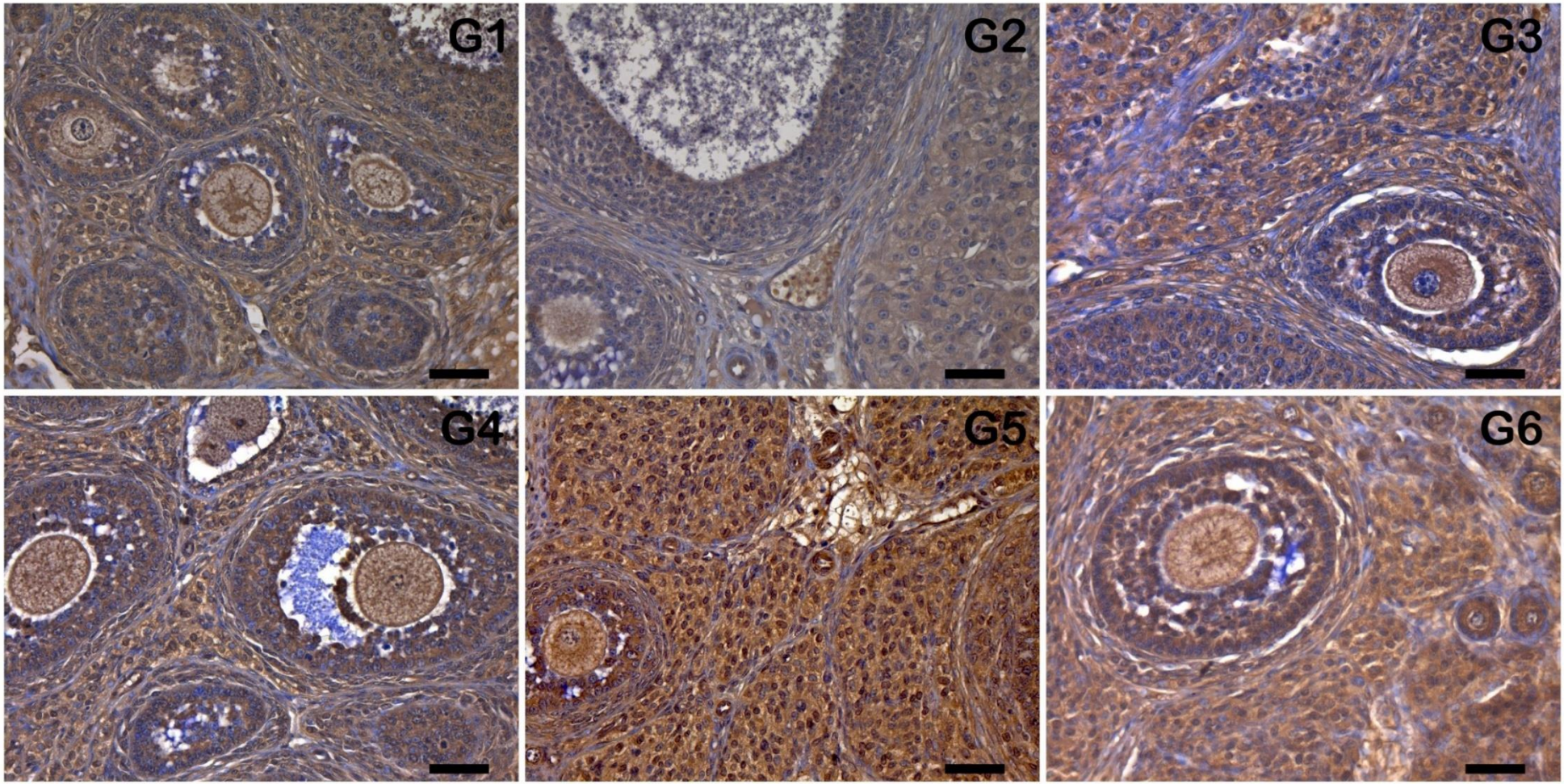


Şekil 45. SPX (+) beyaz yağ dokusuna ait mikrograf izlenmektedir, X100 objektif, Bar: 20 µm.

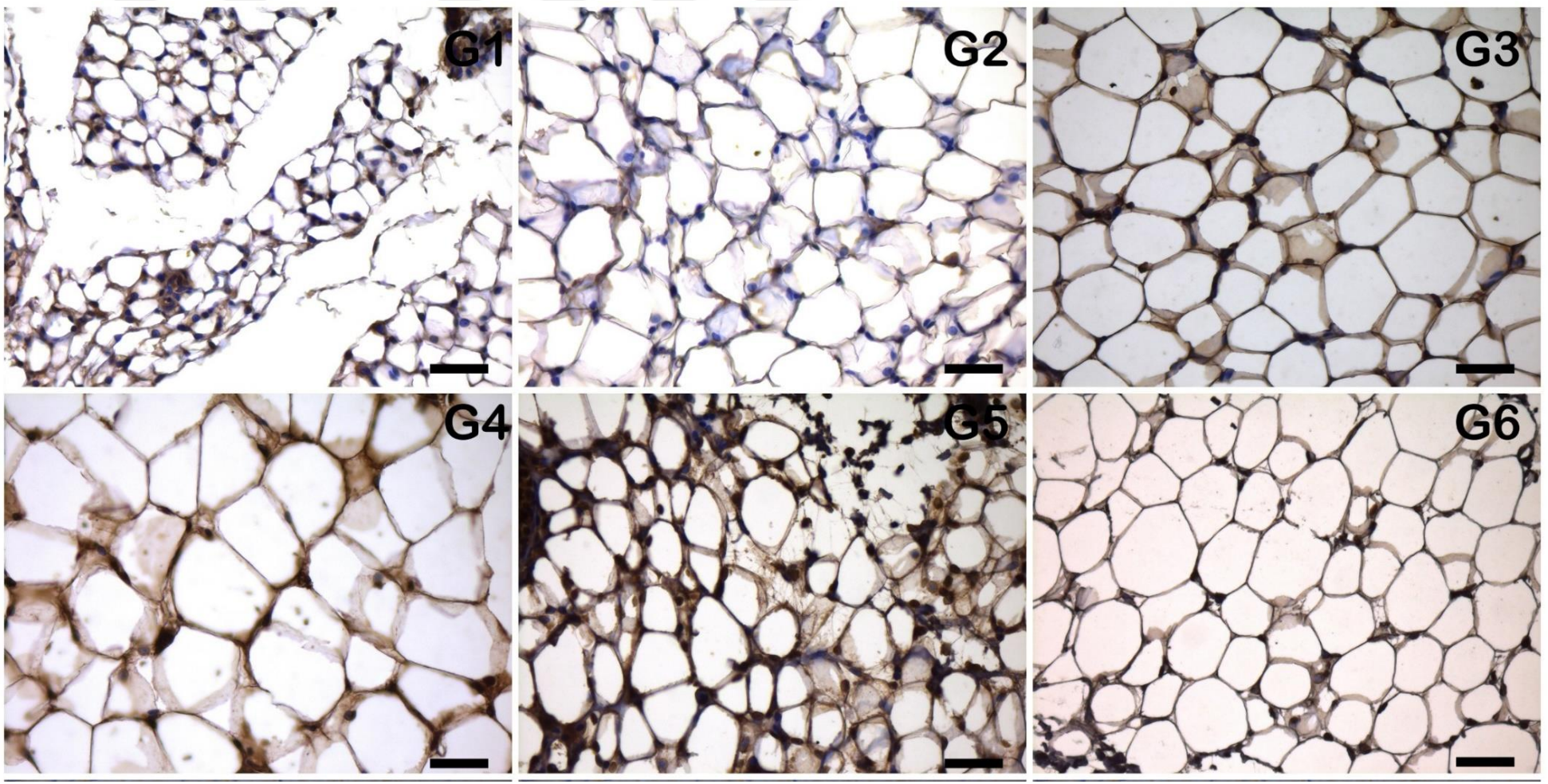
6.3.4. Ovaryum ve Beyaz Yağ Dokusunda SPX Pozitifliğinin Gruplar Arasında İmmünhistokimyasal Değerlendirmesi

Normal yem ile beslenen sıçanlarda ovaryum dokusu speksin boyanma yoğunluğu puberte döneminde prepuberte ve postpuberte dönemlerine göre az boyandı. Yüksek yağlı yem gruplarında boyanma yoğunluğu prepuberte döneminden puberte dönemine geçişte artış ve puberteden postpuberteye geçişte azalma gösterdi (Şekil 46).

Normal yem ile beslenen sıçanlarda beyaz yağ dokusu speksin boyanma yoğunluğu puberte döneminde prepuberte ve postpuberte dönemlerine göre azaldı. Yüksek yağlı yem gruplarında boyanma yoğunluğu prepuberte döneminden puberte dönemine geçişte artış ve puberteden postpuberteye geçişte azalma gösterdi (Şekil 47).



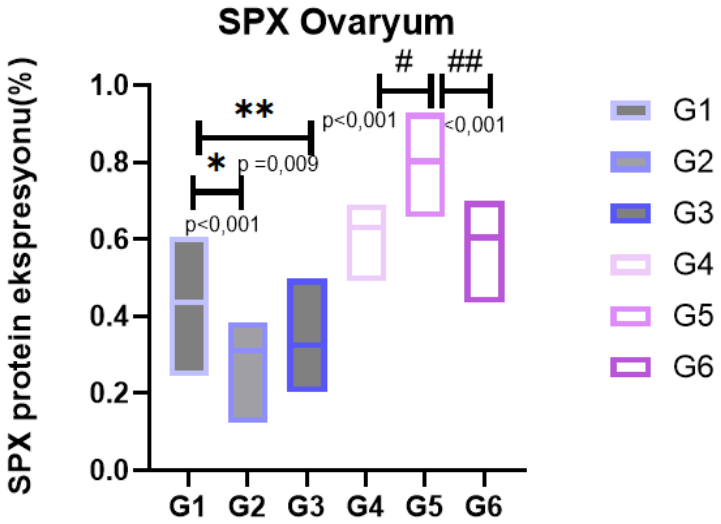
Şekil 46. Deney gruplarından elde edilen ovaryum dokusu SPX (+) immun ifadelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir, x40 objektif, Bar: 50µm.



Şekil 47. Deney gruplarından elde edilen beyaz yağ dokusu SPX (+) immun ifadelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir, x40 obkejtif, Bar: 50 μm.

6.3.4.1. Ovaryum Dokusu ve Beyaz Yağ Dokusu Pozitif SPX Boyanma Yoğunluğu Analizi

Normal yem ile beslenen sıçanlarda ovaryum dokusu speksin boyanma yoğunluğu prepuberte dönemi ile puberte ve postpuberte dönemleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.009$). Yüksek yağlı yem gruplarında prepuberte döneminden puberte dönemine geçişte anlamlı artış ve puberteden postpuberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (her ikisi için, $p<0.001$) (Tablo 5) (Şekil 46 ve 48). Normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen grupların ovaryum dokusu speksin boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında, puberte ve postpuberte dönemlerinde anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) (Şekil 46 ve 48) (Tablo 5).

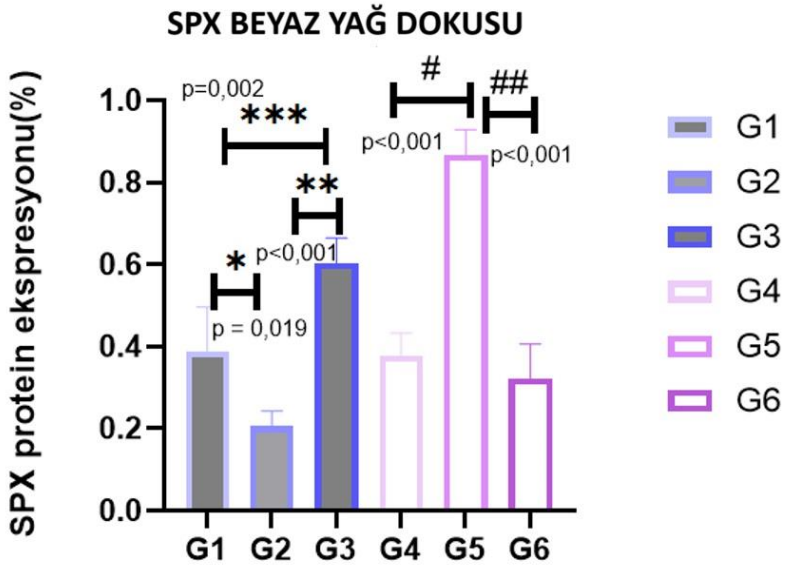


Şekil 48. Sıçanların ovaryum dokusu SPX immunboyama ifadesinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile gösterilmiştir.

Normal yem ile beslenen sıçanlarda beyaz yağ dokusu speksin boyanma yoğunluğu prepuberte dönemi ile puberte ve prepuberte ile postpuberte dönemleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.019$ ve $p=0.002$). Puberte ile postpuberte dönemleri arasında fark anlamlı yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 47 ve 49) (Tablo 5).

Yüksek yağlı yem gruplarında prepuberte döneminden puberte dönemine geçişte anlamlı artış ve puberteden postpuberteye geçişte anlamlı azalma bulundu (her ikisi için $p<0.001$) (Şekil 47 ve 49) (Tablo 5).

Normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen grupların beyaz yağ dokusu speksin boyanma yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında, puberte ve postpuberte dönemlerinde anlamlı fark bulundu ($p<0.001$) (Şekil 47 ve 49) (Tablo 5).



Şekil 49. Sıçanların beyaz yağ dokusu SPX immunboyama ifadesinin gruplar arası karşılaştırılması grafi ile gösterilmiştir

Tablo 5. Sıçanların ovaryum ve beyaz yağ dokusu SPX immunboyama ifadelenmesi

			Yem türü		
	Dönem	n	Normal	Yüksek Yağlı	İstatistik
			Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	Ort±S.Sapma Ortanca(Min-Maks)	p*
Ovaryum dokusu SPX immunboyama ifadelenmesi	Prepuberte D. (G1- G4)	10	0,444±0,092 0,435 (0,243- 0,606)	0,613±0,071 0,630 (0,491-0,690)	p>0.05
	Puberte D. (G2- G5)	10	0,290±0,082 0,312 (0,123-0,384)	0,800±0,088 0,802 (0,658-0,927)	p<0.001
	Postpuberte D. (G3- G6)	10	0,339±0,075 0,325 (0,202-0,497)	0,601±0,080 0,604 (0,435-0,699)	p<0.001
	p¥		p<0.05	p<0.05	
Beyaz yağ dokusu SPX immunboyama ifadelenmesi	Prepuberte D. (G1- G4)	10	0,388±0,107 0,446 (0,201-0,575)	0,379±0,053 0,378 (0,215-0,441)	p>0.05
	Puberte D. (G2- G5)	10	0,205±0,037 0,220 (0,148-0,250)	0,865±0,062 0,860 (0,721-0,960)	p<0.001
	Postpuberte D. (G3- G6)	10	0,603±0,061 0,617 (0,495-0,713)	0,321±0,085 0,325 (0,187-0,458)	p<0.001
	p¥		p<0.05	p<0.05	

¥ Kruskal Wallis Testi * Mann Whitney U Test

*G1-G2-G3 ile ifade edilen gruplar normal yem ile beslenen grubu, G4-G5-G6 ile ifade edilen gruplar yüksek yağlı diyet (HFD) ile beslenen grubu ifade eder.

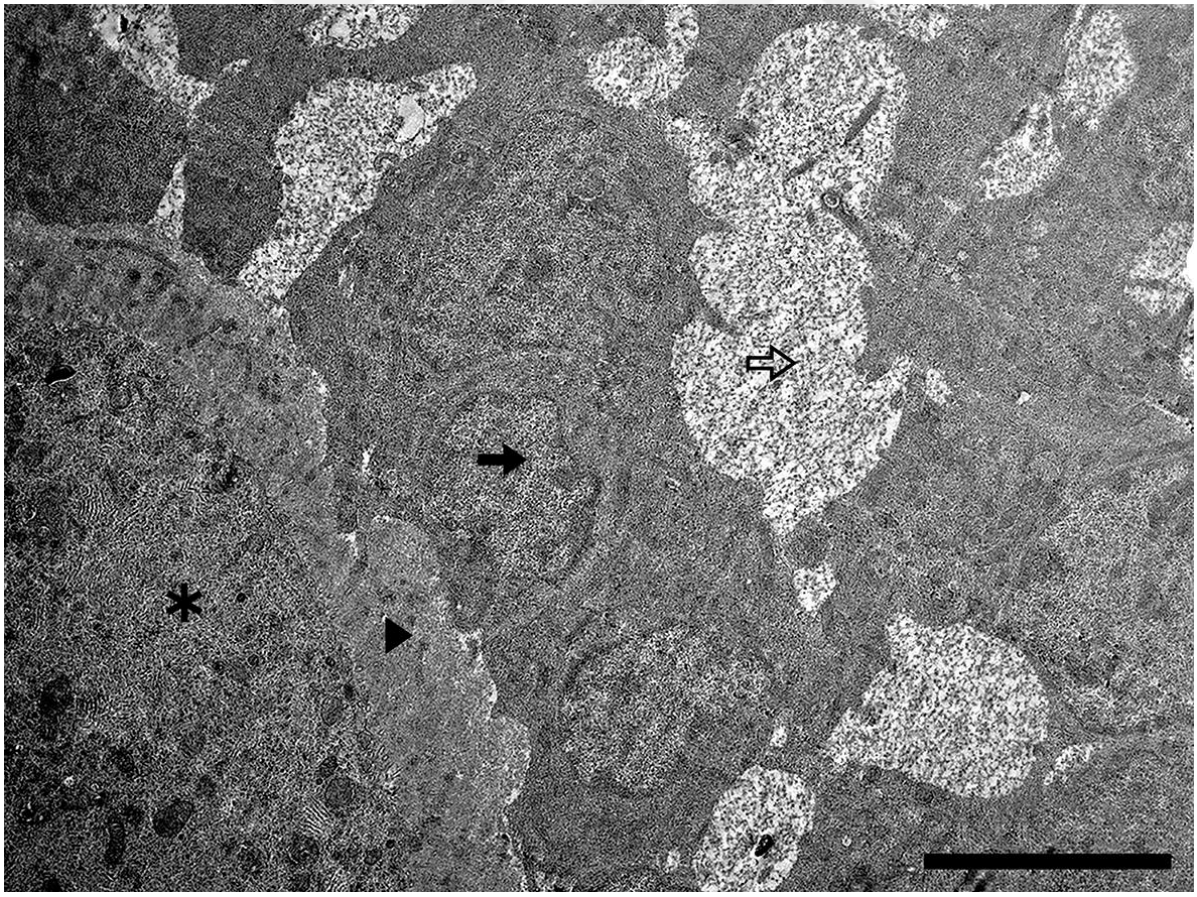
**G1 ifadesi pretpuberte dönemini (PN 28), G2 ifadesi puberte dönemini (PN 42) ve G3 ifadesi postpuberte dönemini (PN70) ifade eder.

***G4 ifadesi prepuberte dönemini (PN 28), G5 ifadesi puberte dönemini (PN 42) ve G6 ifadesi postpuberte dönemini (PN70) ifade eder.

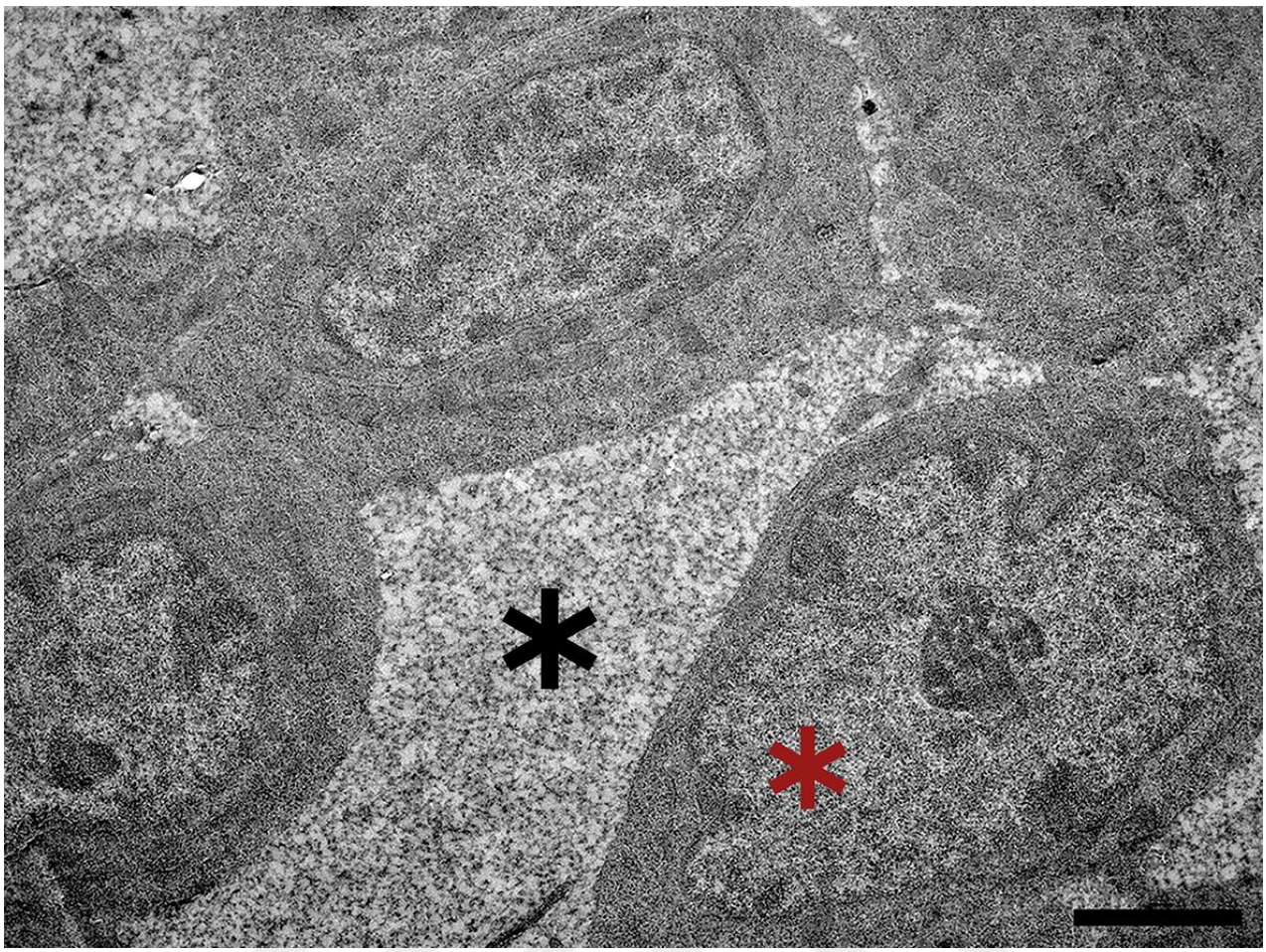
6.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu Bulguları

Ovaryum dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesinde; normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen gruplarda folikül içinde bulunan ovositin merkezi yerleşimli çekirdeği görüldü. Sitoplazmada bol miktarda mitokondriyonlar ve endoplazma retikulumu izlendi. Perivitellin boşluğa doğru çıkıntı yapan çok sayıda parmak benzeri mikrovilluslar ve zona pellusida görüldü.

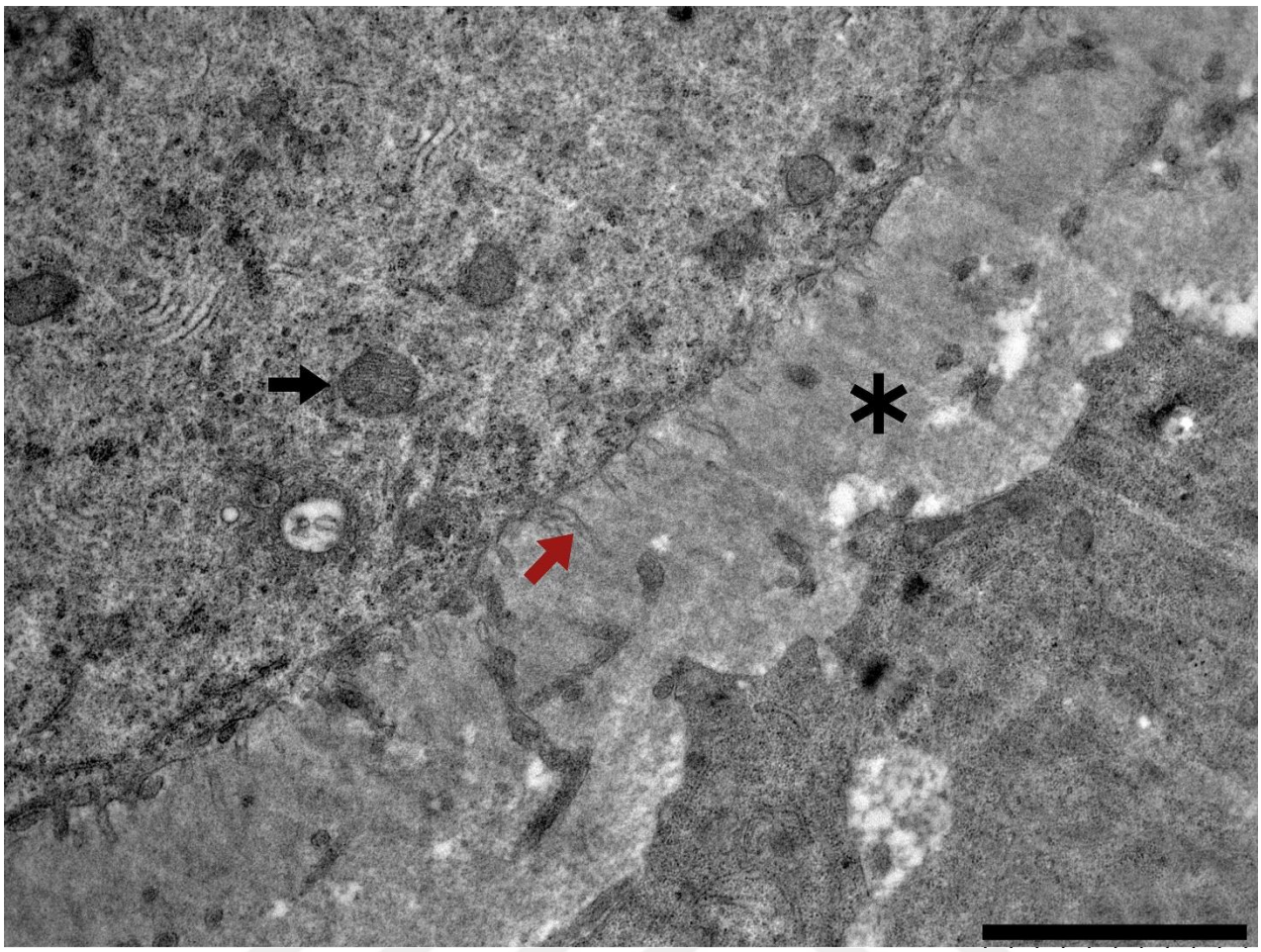
Ovositi çevreleyen zona pellusidaya komşu konsatrik katlar oluşturan granüloza hücreleri, folikül gelişim evrelerine uyumlu şekilde aralarında antral boşluklar oluşturmuş şekilde izlendi. Granüloza hücrelerinin çekirdekleri belirgin sitoplazmalarında mitokondriyon ve endoplazma retikulumu görüldü. Granüloza hücre katmanlarının dış kısmında yassılaşmış teka hücreleri ve komşuluğunda kapiller damar endotel yapıları izlendi. Teka hücrelerinde steroid sentezi artışı ile ilişkili lipid damlacıkları gözlendi. Normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen gruplar arasında aynı pubertel dönemlere göre yapısal farklılık izlenmedi (Şekil 50-62).



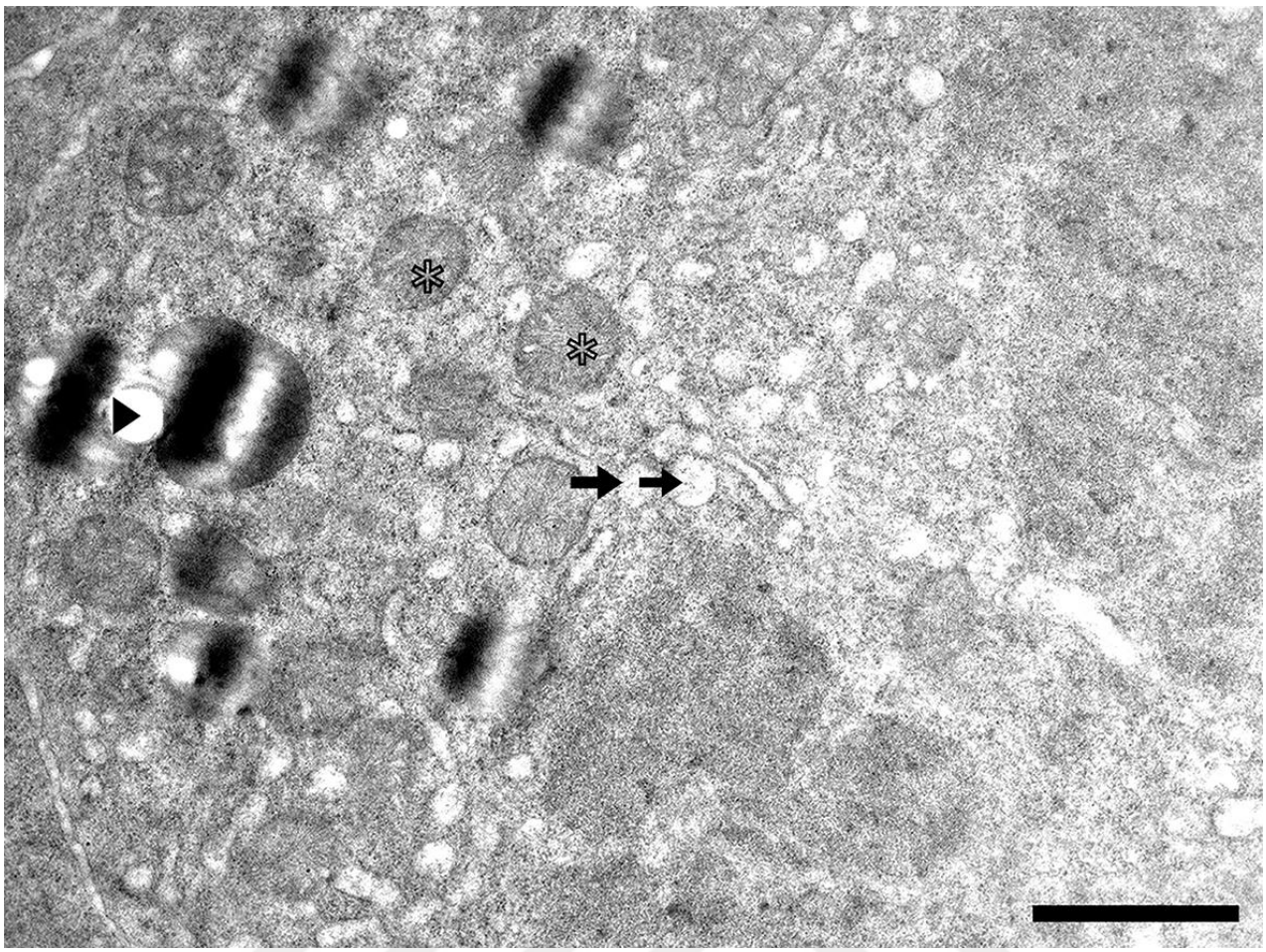
Şekil 50. Prepuberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda ovosit sitoplazması (asteriks), zona pellusida (ok başı), granüloza hücresi (ok) ve antral boşluk (boş ok) izlenmektedir. 3000 büyütme, Bar: 5 μm.



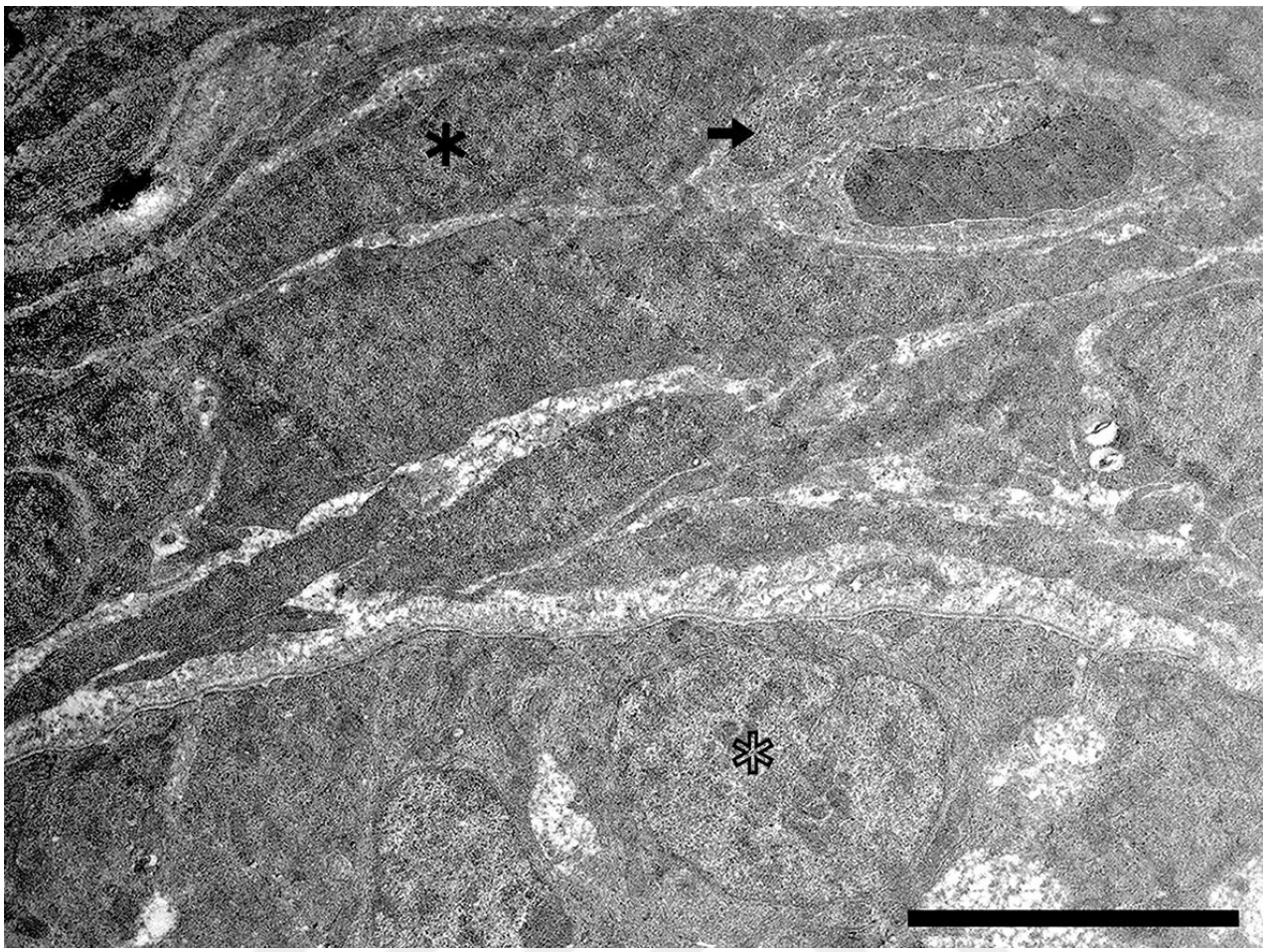
Şekil 51. Prepuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu folikül sıvısı (siyah asteriks) ve granüloza hücresi çekirdeği (kırmızı asteriks) izlenmektedir.5000 büyütme, Bar: 2 µm.



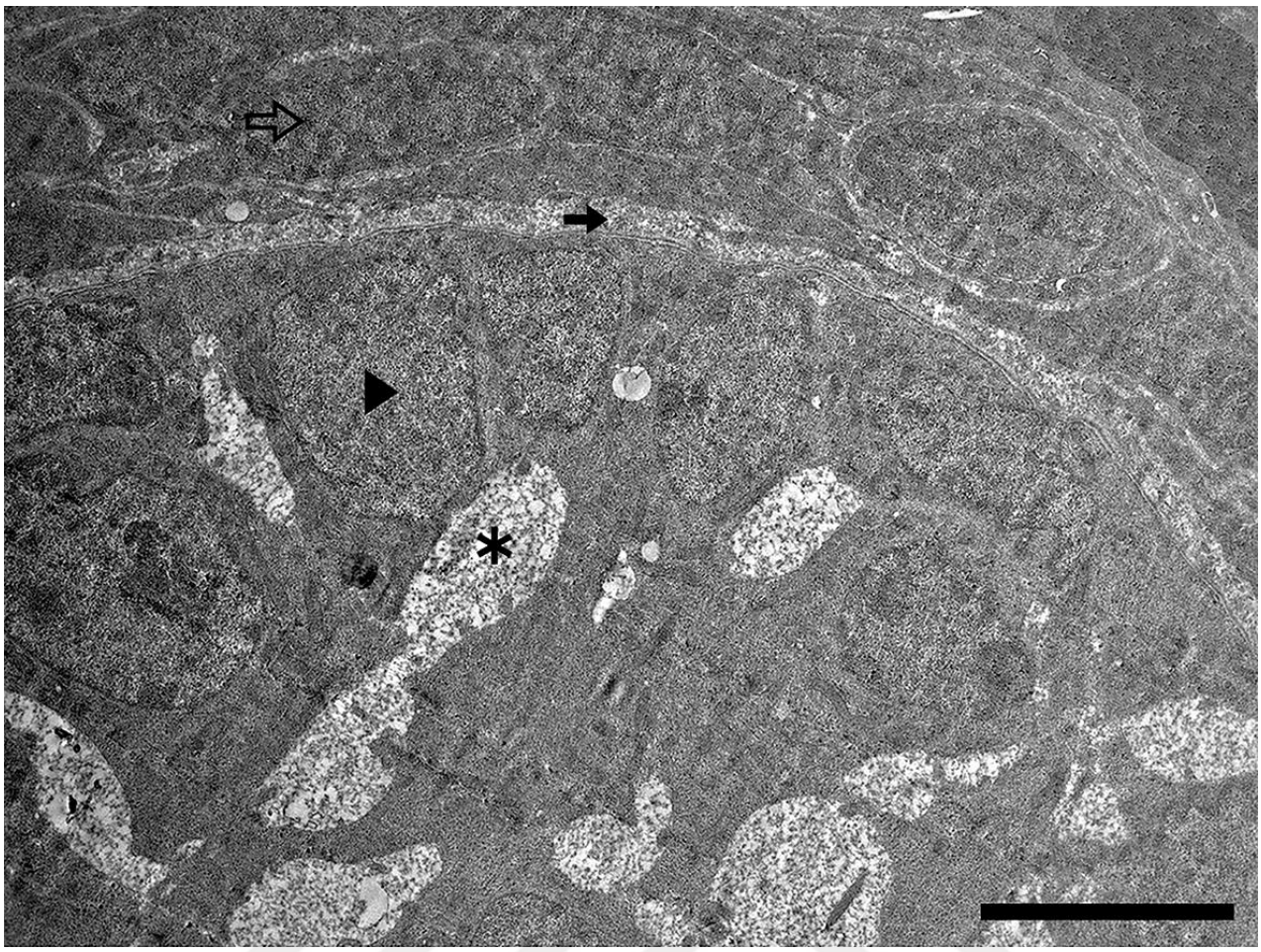
Şekil 52. Puberte dönemi, normal yem ile beslenen grup, ovaryum dokusunda mitokondriyon (siyah ok), ovosit mikrovillusları (kırmızı ok) ve zona pellusida (asteriks) izlenmektedir. 8000 büyütme, Bar: 2 µm.



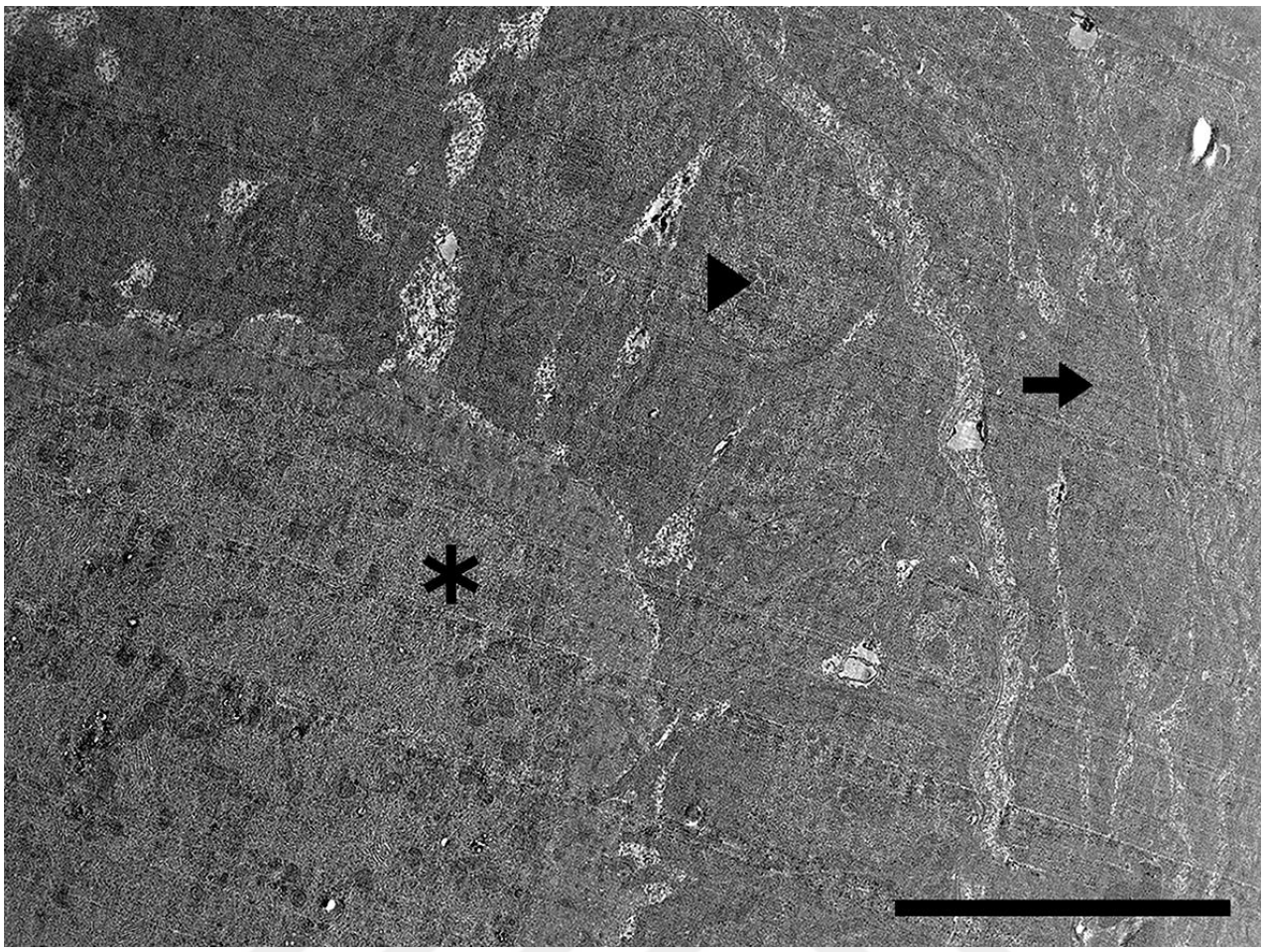
Şekil 53. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresinde mitokondriyon (içi boş asteriks), granülsüz endoplazma retikulumu (ok) ve lipit damlacıkları (ok başı) izlenmektedir. 12000 büyütme, Bar: 1 μm.



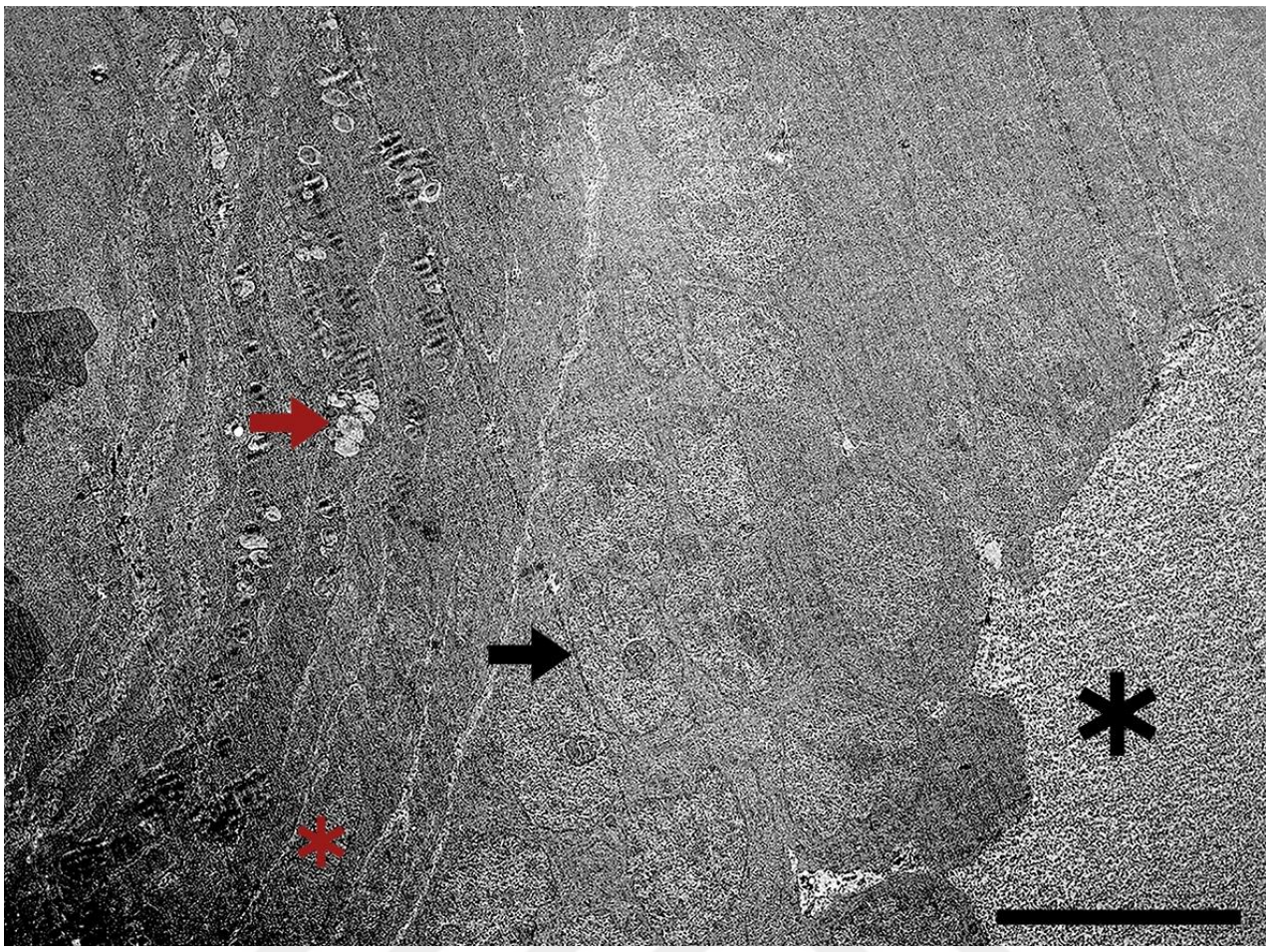
Şekil 54. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda granüloza hücresi (içi boş asteriks), teka hücresi (içi dolu asteriks), ve endotel çekirdeği (ok) izlenmektedir. 4000 büyütme, Bar: 5 µm.



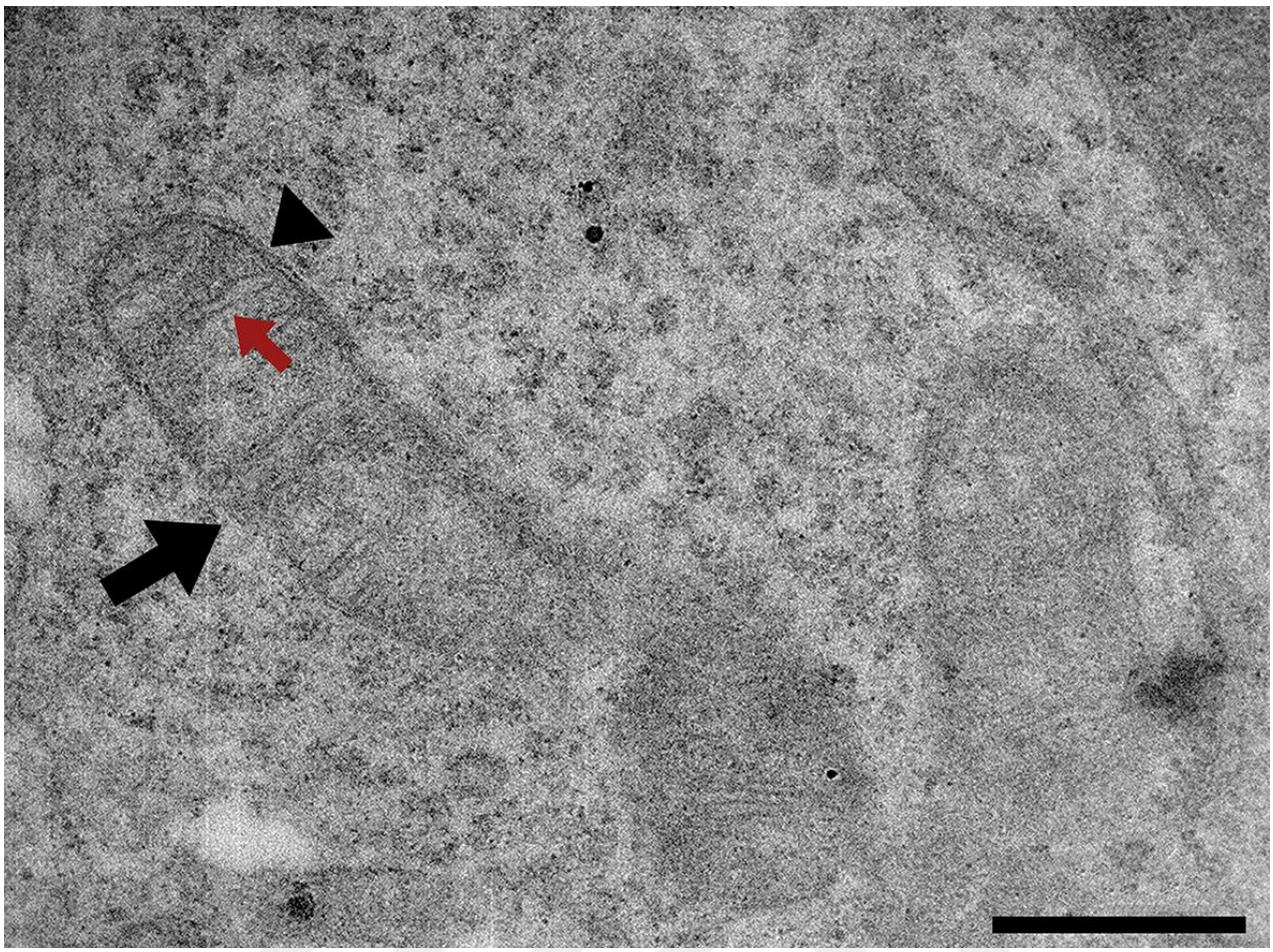
Şekil 55. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda antral boşluk (asteriks), granüloza hücresi (ok başı), bazal lamina (ok) ve teka hücresi (içi boş ok) izlenmektedir. 3000 büyütme, Bar: 5 μm.



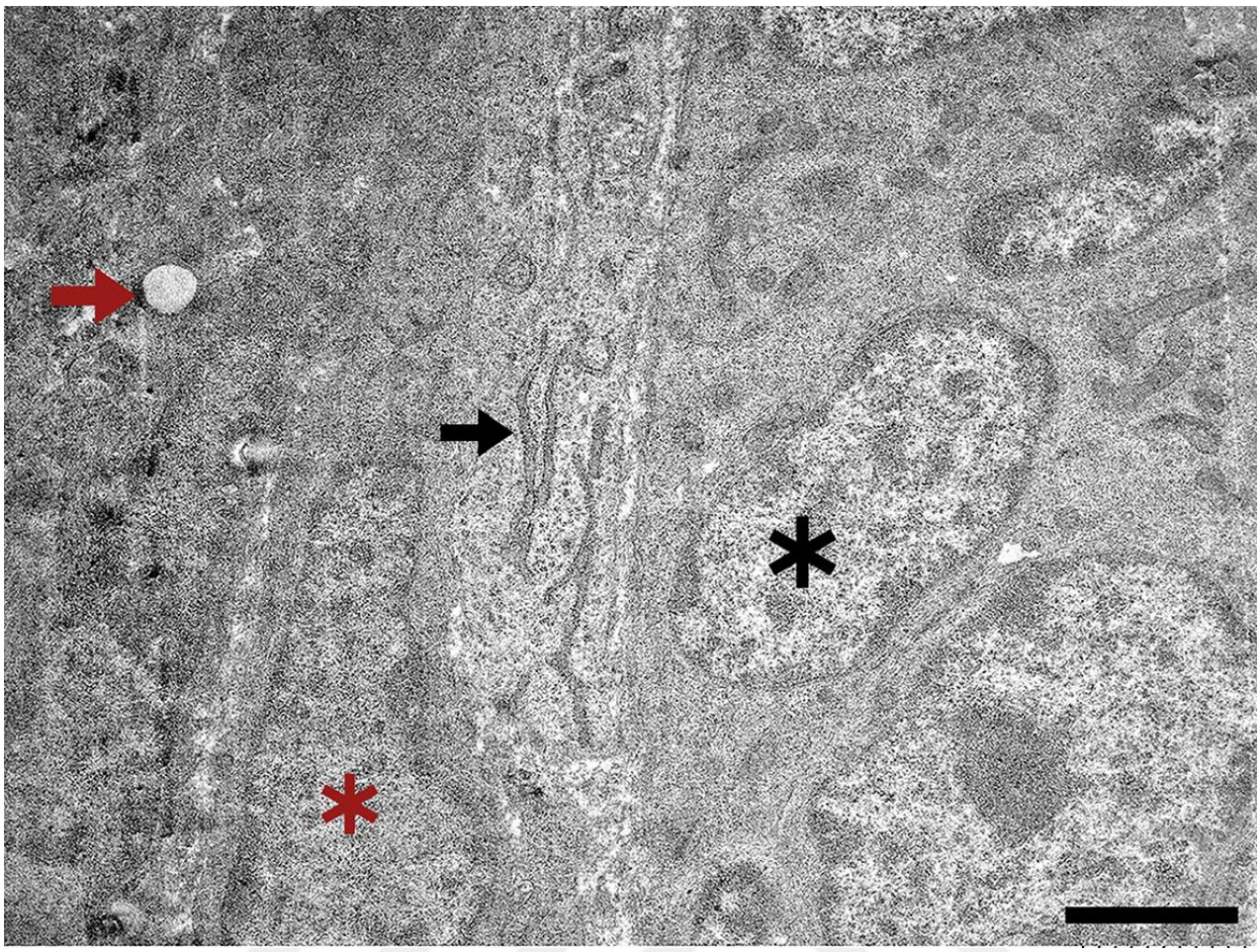
Şekil 56. Puberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusunda ovosit sitoplazması(asteriks) granüloza hücresi (ok başı) ve teka hücresi (ok) izlenmektedir. 2000 büyütme, Bar: 10 μm.



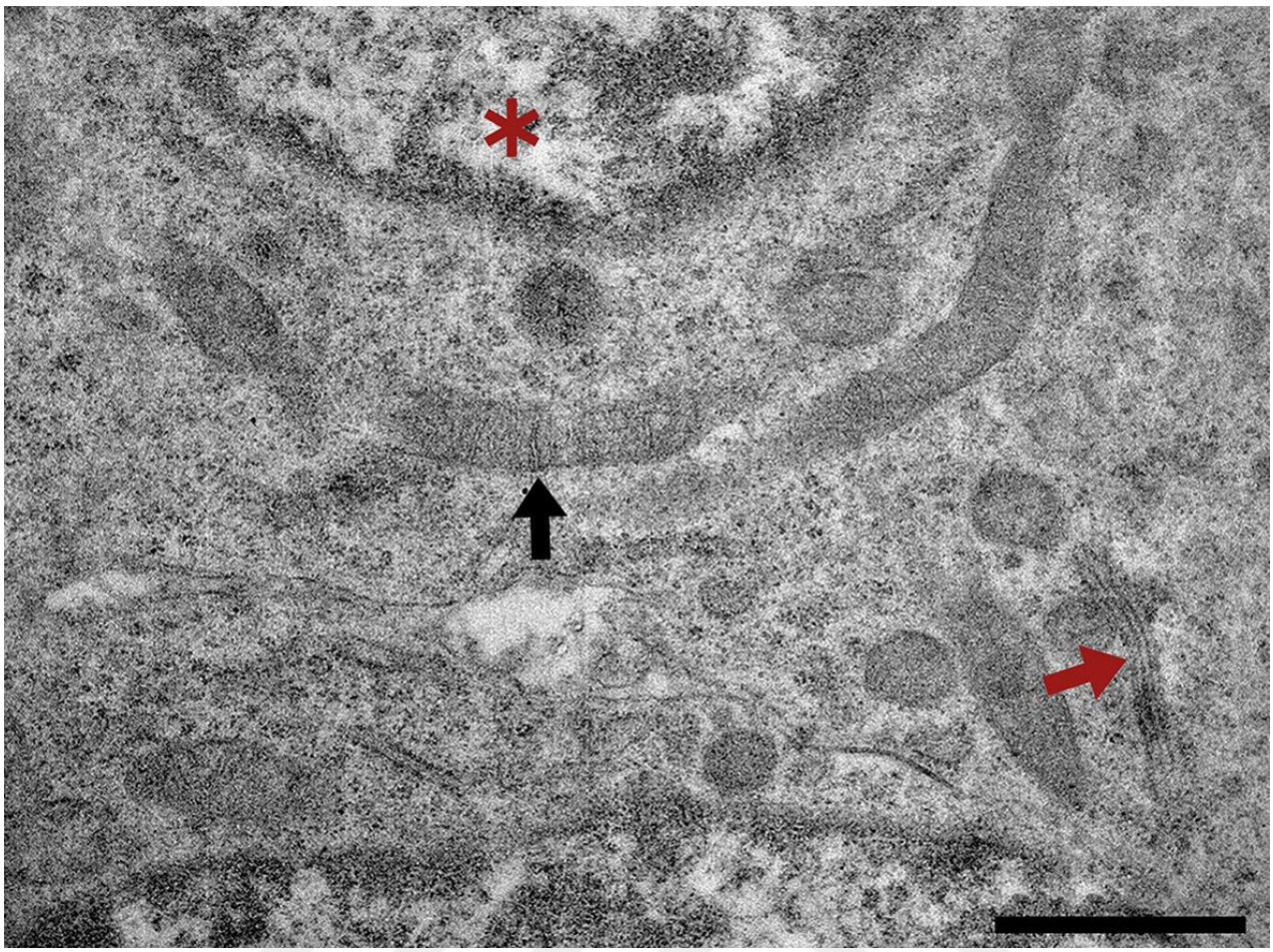
Şekil 57. Puberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu folikül sıvısı(asteriks), granüloza hücresi (siyah ok), teka hücresi (kırmızı asteriks) ve lipit damlacıkları (kırmızı ok) izlenmektedir. 1500 büyütme, Bar: 10 μm.



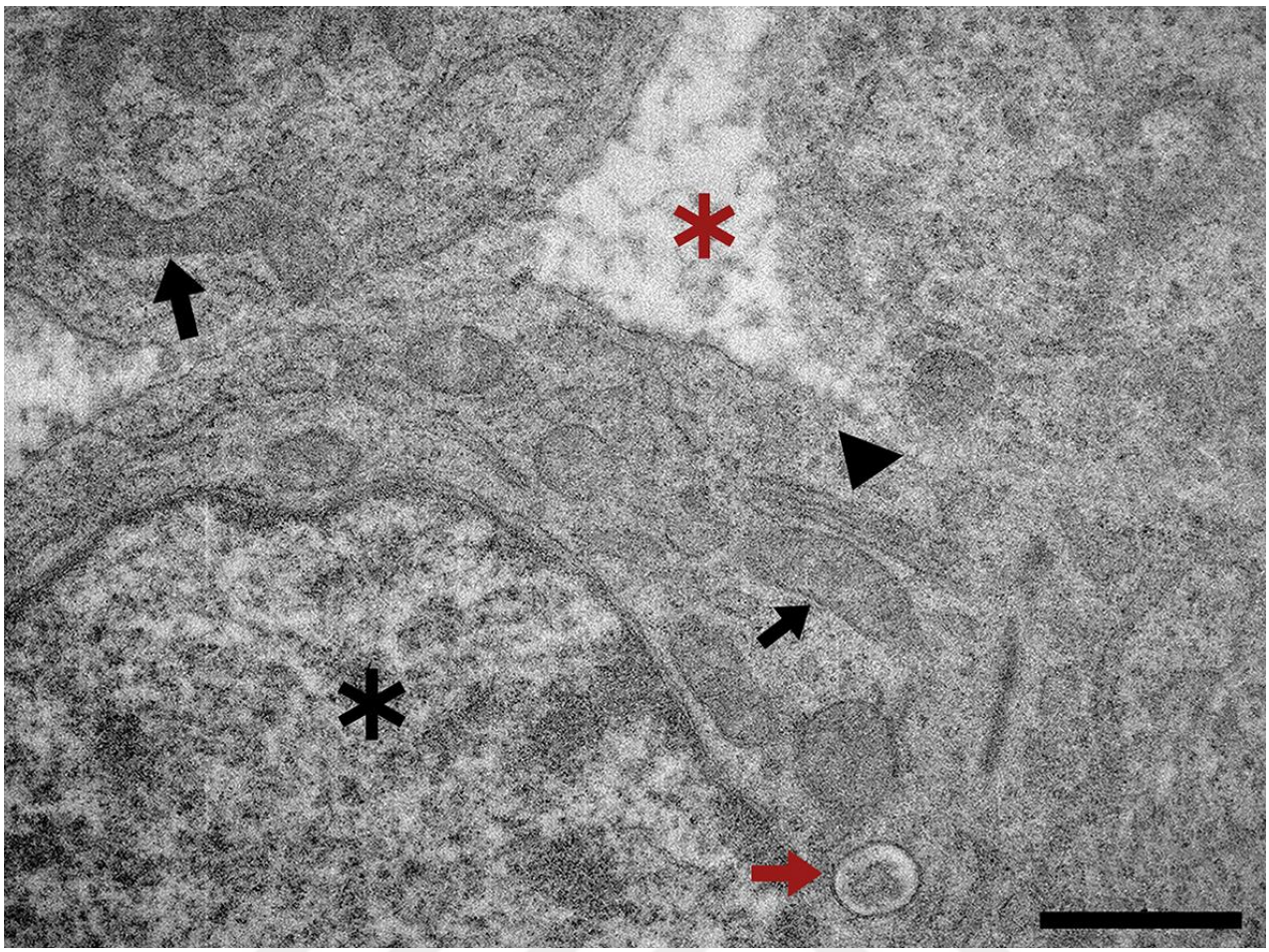
Şekil 58. Postpuberte dönemi normal yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresi tübüler kristalı mitokondriyon (siyah ok), mitokondriyon kristası (kırmızı ok) ve mitokondriyon çift katlı membranı (ok başı) izlenmektedir.30000 büyütme, Bar: 500 nm.



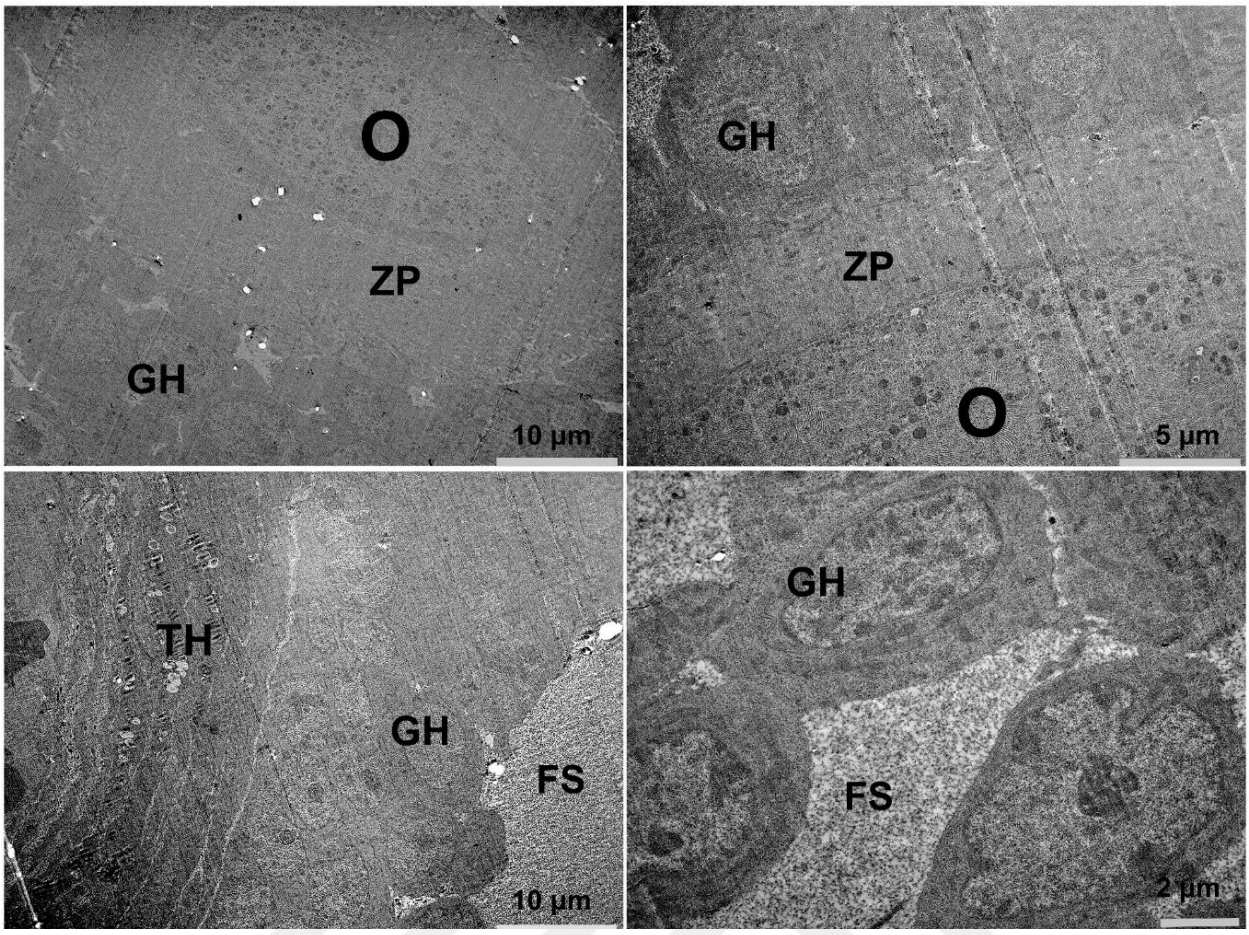
Şekil 59. Postpuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresi (siyah asteriks), granüllü endoplazma retikulum (siyah ok), teka hücresi (kırmızı asteriks) ve lipit damlacıkları (kırmızı ok) izlenmektedir. 5000 büyütme, Bar: 2 µm.



Şekil 60. Postpuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücresi granüllü endoplazma retikulumu (kırmızı ok), tübüler kristalı mitokondriyon (siyah ok) ve granüloza hücresinin çekirdeği (kırmızı asteriks) izlenmektedir. 15000 büyütme, Bar: 1 µm.

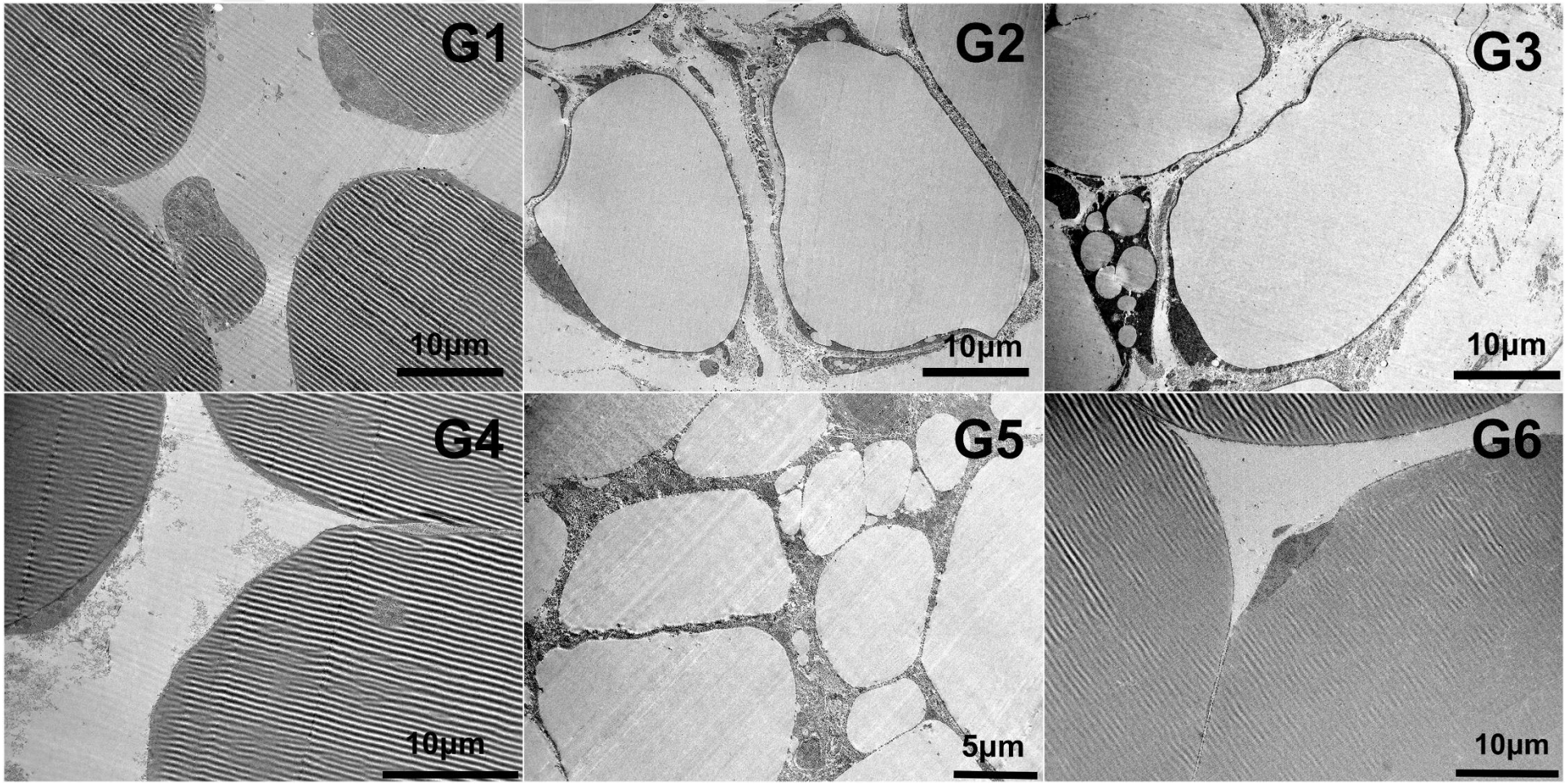


Şekil 61. Postpuberte dönemi yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanların ovaryum dokusu granüloza hücre çekirdeği (siyah asteriks), tübüler kristalı mitokondriyon (siyah ok), granüllü endoplazma retikulumu (ok başı), granülsüz endoplazma retikulumu (kırmızı ok) ve foliküler sıvı (kırmızı asteriks) izlenmektedir. 12000 büyütme, Bar: 1 μm.



Şekil 62. Ovaryum dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesi ile ovosit (O), zona pellusida (ZP), granüloza hücresi (GH), teka hücresi (TH) ve foliküler sıvı (FS) farklı büyütmelerde gösterilmiştir. Sırasıyla Bar: 10 µm, 6 µm, 10 µm ve 2 µm.

Normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen deney hayvanlarından elde edilen farklı pubertal dönemlere ait subkutan beyaz yağ dokusu örneklerinin ince yapı düzeyinde incelenmesinde, adipositlerin uniloküler yağ damlacıkları ile dolu olduğu, çekirdeğin perifere itilerek yassılaştığı izlendi. Gruplar arasında belirgin farklılık gözlenmedi (Şekil 63).



Şekil 63. Deney gruplarından elde edilmiş beyaz yağ dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesine ait mikrograflar izlenmektedir. Bar: 10 µm.

7. TARTIŞMA

Sağlıklı gençlerde, ergenliğin ortalarında insülin duyarlılığında fizyolojik azalma gözlenmektedir. Ergenliğin tamamlanmasıyla düzelen bu durum ergenliğe giren obez gençlerde ise, insülin direncinin (İD) çözülmeyerek, kardiyolojik ve metabolik hastalık riskinin artmasına neden olabilir. Ergenlikte İD' nin altında yatan patofizyolojik mekanizma ve bu artmış hastalık riskine nasıl katkıda bulunduğu hakkında çok az şey bilinmektedir [37]. Speksin, obezitenin neden olduğu insülin direnci ve T2DM'nin patofizyolojisinde önemli rol oynayan bir adipokindir. Adipoz dokular endokrin bir organ olarak kabul edilir. Adipokinler yağ dokusunda glukoz ve lipid metabolizmasını düzenler ve otokrin, parakrin veya endokrin mekanizmalar ile hedef dokuda etki gösterir [3]. Speksinin yağ dokusu seviyelerinin dolaşımdaki seviyeleri ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu da insüline duyarlı dokularda lipid ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde kapsamlı bir endokrin rolü vurgulamaktadır. Metabolik bozuklukların varlığı (örneğin, obezite ve inflamasyon) devam ettiğinde, yağ dokusunda speksinin ekspresyonu azalır ve bu koruyucu etki azalarak yağ dokusunu ve iskelet kasını insülin direncine duyarlı hale getirir [4].

Bilgimiz dahilinde çalışmamız SPX' in puberte evreleri ile ilişkisini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızda puberte evreleri ile ağırlık artışı ve puberte zamanını değerlendirdiğimizde beklendiği üzere ağırlık artışı en fazla en geç sakrifiye edilen gruptaydı. Yüksek yağlı beslenme ile erken puberte ilişkisinin gösterildiği Zhou ve arkadaşlarının çalışmasının aksine normal yem ile beslenen grubumuzun puberte yaşı erkendi [33]. Bu durumu ağırlık artışının en fazla normal yem ile beslenen grupta olması ile açıklayabiliriz.

Çalışmamızda prepuberteden puberteye geçişte HOMA-ID de artış gözlendi. Literatürde puberte dönemindeki insülin direnci dişi farelerde insana benzer şekilde gözlenmektedir, ancak en net olarak vajinal açılma anında görülür [38].

Çalışmamızda serum SPX, kisspeptin ve s-leptin düzeyleri tüm gruplarda prepuberteden puberteye geçişte anlamlı azalma gösterdi. Literatürde serum kisspeptin düzeylerinin puberte döneminde zirveye ulaştığı (PNG 27) ancak puberte döneminin tamamlanmasıyla (vajinal açıklık zamanı) seviyelerin düşmeye başladığı belirtilmiştir [39].Bu sonuç bulgularımızla benzerdir.

KISS ve SPX düzeyleri; HOMA-ID, insülin, glukagon, aktif ghrelin ve leptin ile negatif korelasyon gösterir. Obezitede serum SPX ve KISS düzeyleri azalmıştır ve SPX'in serum leptin düzeyleriyle negatif korele olduğu bildirilmiştir [40]. Çalışmamızda serum SPX düzeyi prepuberte döneminde normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen gruplar ile karşılaştırıldığında normal yemde düşük olması ağırlık artışının normal yem ile beslenen grupta fazla olması ile açıklanabilir.

IGF-I geninin, pubertenin erken proöstrus evresinde karaciğerde önemli ölçüde arttığı ve bunun sonucunda, pubertenin geç proöstrus evresinde serum IGF-I seviyelerinde yükselme olduğu ve buna eşlik eden serum gonadotropin seviyelerindeki artış gözlendiği belirtilmiştir. Çalışmamızda serum IGF-1 düzeylerinde anlamlı fark bulunmadı. Bu durumu deney planımızda sakrifikasyon tarihlerini vajinal açıklık zamanına göre belirlememize bağlıyoruz. Sıçanlarda östrus döngüsünün süresi 4-5 gün arasında değişmekte ve erken proöstrus, geç proöstrus ve diöstrus dönemlerinde IGF-1 düzeyleri değişiklik göstermektedir [41].

6 haftalık (PNG 42) sıçanlarda ve 8 haftalık (PNG 56) sıçanlarda serum leptin, östradiol ve FSH değerleri, 4 haftalık (PNG 28) sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [42]. Bizim çalışmamızda farklı olarak normal yem ile beslenen grupta serum leptin ve östrodiol düzeylerinde anlamlı fark saptanmadı. Dişi sıçan hipofiz gonadotropunda Ob-Rb (uzun form leptin reseptörü) ifadesinin ergenlik gelişimi sırasında düştüğü gösterilmiştir [42]. Bizim de çalışmamızda bu çalışmaya benzer şekilde normal yem grubunda serum s-leptin düzeylerinde puberte döneminde prepuberte dönemine göre anlamlı azalma gözlendi.

Kemirgenlerde serum LH seviyelerinin yaklaşık bir hafta boyunca PNG 4 ila 18 arasında yüksek olduğu ve farelerde LH ovulatuar dalgalanmanın PGN 14'te olduğu gösterilmiştir. LH' nin PNG 27' de serum düzeyinin proestrus dönemine göre az olduğu proestrusta pik yaptığı ifade edilmiştir [32]. Çalışmamızda benzer şekilde PNG 28 (prepuberte) de serum LH düzeyinin puberte dönemine göre yüksek olduğu gözlendi.

Yüksek yağlı yem ile beslenmenin sütten kesme öncesi ve sonrası dönemde puberte başlangıcına veya kisspeptin düzeyleri üzerine etkisinin olmadığı belirtilmiştir [43]. Çalışmamızda yüksek yağlı yem ile beslenen grupta normal yem ile beslenen gruba göre kilo artışı olmamış ve vajinal açıklık zamanlarında anlamlı fark bulunmamıştır.

Obez ve PCOS (Polikistik Over Sendromu)'lu kadınların granüloza hücresinde (GH) SPX gen ekspresyonunun ve foliküler sıvıda konsantrasyonunun azaldığı, SPX reseptörü olan

GALR2/3'ün protein ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir. SPX, GH proliferasyonunu ve steroidogenezi azaltır. SPX'in insan ovaryum fizyolojisinin yeni bir düzenleyicisi olduğu ve PCOS patogenezinde rol oynadığı açıkça gösterilmiştir. [33]. Çalışmamızda fizyolojik insülin direncinin olduğu puberte döneminde SPX değerleri serum ve ovaryumda anlamlı düşük bulundu.

Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, leptinin sıçanda pubertal olgunlaşmayı sağlamasına rağmen, prepubertal bir hayvanda tek başına varlığının, yüksek seviyelerde bile olsa, leptinin ergenliği öne çekmek için yeterli olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, farede normal prepubertal hayvanlara leptin uygulanmasının ergenliğin başlangıcını geciktirebileceğini gösteren sonuçlar da vardır [44]. Görünüşte çelişkili olan bu bulguların gerçek tür farklılıklarını mı yoksa deneysel sonuçlardaki farklılıkları mı yansıttığı bilinmemektedir. Deneysel çalışmalarda varılan fikir birliği, artan plazma leptin seviyelerinin sıçanda ergenliği başlatan tetikleyici olay olma ihtimalinin düşük olduğunu göstermektedir. Leptin reseptörü ifadesinde yaşa bağlı bir değişikliğin sıçanda ergenliğin başlangıcını yönetmede rol oynadığı hipotezini destekleyecek hiçbir kanıt sunulmamıştır [45]. Bulgularımız leptin ve leptin reseptörlerinden ziyade speksinin puberte başlangıcının daha iyi bir göstergesi olabileceğini düşündürmüştür.

Hipofizdeki Ob-Rb (long form leptin receptor) mRNA ekspresyonunun pubertal gelişim boyunca juvenil dönem (PNG 28) ile olgun dönem (PNG 56) arasında düştüğü gösterilmiş olup çalışmamızda da benzer şekilde s-leptin düzeyi normal ve yağlı yem ile beslenen gruplarımızda gösterilmiştir [42].

Puberte başlangıcının zamanlaması PNG 30 ila 34 arasında vajinal açıklık incelenerek değerlendirilmiş ve vajinal açıklık günü puberte başlangıcı olarak kabul edilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde yüksek yağlı yem ile beslenmenin, yüksek yağlı yem gruplarının hiçbirinde ergenlik başlangıcının zamanlaması üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir. Literatürde yüksek yağlı yem ile beslenme, östrus fazını uzatarak sıçanların %33’ ün de düzensiz östrus döngülerine neden olmuştur. Çalışmamızda yüksek yağlı yem ile beslenen puberte grubunda gözlenen SPX artışına bozulmuş östrus döngüsünün neden olabileceği düşünülmüştür Yapılan bir çalışmada nihai vücut ağırlığı, kontrol grubuna kıyasla düzenli beslenen grupta daha yüksekken, düzensiz beslenen grupta değişmemiştir. Çalışmamızda beslenme kontrolleri yapmamamız kısıtlılık teşkil etmektedir Çalışmamıza benzer şekilde, kullanılan yüksek yağlı yem ile beslenmenin (%60 yağdan gelen enerji) puberteyi öne çekmediği gösterilmiş olup vücut ağırlığı artışında yüksek yağlı yem ile beslenmenin neden

olduğu değişikliklerin ise ya çok az ya da hiç katkısının olmadığı belirtilmiştir [43],[46-49]. Bu durum, ayarlanmış gıda alımı, peri-pubertal ve yetişkin sıçanlar arasındaki metabolizma farklılıkları veya çok kısa beslenme penceresi gibi çeşitli faktörlerle açıklanabilir. Sıçanların standart bir yemekten yüksek kalorili bir diyete geçerken gıda alımlarını ayarlayabildikleri, böylece günlük kalori alımının değişmeden kaldığı gösterilmiştir. Ayrıca diğer çalışmalara benzer şekilde, yüksek yağlı yem ile beslendikten sonra leptin seviyelerinde peripubertal sıçanlarda değil yetişkin sıçanlarda da değişiklikler bulunmuştur. Bu durum peri-pubertal ve yetişkin dişi sıçanlar arasındaki metabolizma farklılıklarına işaret ediyor olabilir [50]. Bizim çalışmamızda yüksek yağlı yem ile beslenen grubun serum leptin düzeyi prepuberte ve yetişkin grubunda yüksek bulunmuş olup puberte döneminde düşük izlenmiştir. Bu durumu metabolizma farklılıklarına bağlayabiliriz.

Kemirgen modellerinde, gıda alımı östrus döngüsü boyunca dalgalanır ve beslenme davranışını düzenleyen hipotalamik nöropeptidlerin çoğu östrus fazından etkilenir. Dişi sıçanların diöstrus sırasında proöstrus veya östrus'tan daha fazla kalori tükettiği, östrustaki sıçanların en az kaloriyi tükettiği gösterilmiştir [51]. Çalışmamızda sakrifiye edilen günlere göre, östrus döneminde olan sıçanlarda, beslenme ve nöropeptid düzeyleri etkilenmiş olabilir.

Yapılan çalışmada sıçanların östrus evresi günün daha erken saatlerinde gözlendiğinde ve östrus evresi ile sakrifikasyon arasındaki süre uzun olduğunda LH ve östrodiol dalgalanmaları tespit edilememiştir. Gruplardan daha kısa östrus evresi ve daha erken sakrifiye zamanları olan grupta LH ve östradiol dalgalanmaları tespit edilmiştir [52]. Çalışmamızda sıçanların östrus dönemlerine göre sakrifiye edilememesi LH ve östrodiol dalgalanmasını görememize neden olmuştur.

Serum kisspeptin düzeyleri peripubertede zirveye ulaşır (PNG 27). Ancak ergenliğin tamamlanmasıyla azalmaya başlar. Ovaryum Kiss1 mRNA seviyeleri peripubertal aşamada önemli ölçüde hızlı bir şekilde artarken PNG 23'te zirveye ulaşır ve ergenlik tamamlanana kadar kademeli olarak azalır [39]. Çalışmamızda bu çalışmaya benzer şekilde serum kisspeptin değerleri PNG 28 de yüksek iken vajinal açıklık sonrası PNG 42 de düşük bulunmuştur.

Foliküler fazın sonunda (kemirgenlerde proöstrus), yüksek östradiol seviyeleri, GnRH salınımında büyük ve sürekli bir artışa neden olan pozitif geri bildirimi tetikler. GnRH'ye karşı gonadotrop hücre duyarlılığındaki artışla birlikte bu GnRH “dalgalanması”, hipofizden LH salınımında bir artışa neden olur. LH'nin ovulasyon dalgalanması tüm dişi memelilerde görülür ve kemirgenlerde ovulasyon için gereklidir [32]. Bizim çalışmamızda benzer şekilde PNG 28

de serum LH düzeyi proöstrus dönemi ile uyumlu şekilde yüksek ölçülüp, puberte döneminde azalmıştır.

Yüksek yağlı yem gruplarındaki kisspeptin ekspresyon seviyeleri için ortalama optik yoğunluk, antral foliküllerin teka hücrelerindeki kisspeptin ekspresyon seviyelerinin, PNG 42' de proöstrus ve östrus sırasında ve PNG 70' te proöstrus ve östrus sırasında önemli ölçüde düşük bulunmuştur [33]. Çalışmamızda yüksek yağlı yem gruplarında ekspresyon seviyelerinde azalma yerine artma görülmüştür.

Ovaryum Kiss1 ekspresyonu proöstrus sırasında öğleden sonra zirve yapar. Bu saptama ovulasyon sürecinde kisspeptinin düzenleyicileri olduğunu düşündürmüştür [53, 54]. Bizim çalışmamızda sıçanlar östrus döngülerinin rastgele evrelerine göre sakrifiye edildiği için SPX ekspresyonu östrus döngüsüne göre değerlendirilememiştir. Literatürde kisspeptin ekspresyonu proöstrus ovaryumundan alınan preovulatuar foliküllerin teka hücrelerinde, normal yemle beslenenlere kıyasla yüksek yağlı yem ile beslenen grupta baskılanmıştır. Bununla birlikte, antral ve preovulatuar foliküllerde yüksek yağlı yem ve normal yemle beslenen grupları arasında kisspeptin reseptörü olan GPR54' ün boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hem PNG 42 hem de PNG 70'te, antral foliküllerin teka hücrelerindeki kisspeptin ve GPR54 için ortalama optik yoğunluğu, farklı östrus evrelerinde normal yemle beslenen gruplarında proöstrus sırasında nispeten yüksek bulunmuştur [33]. Çalışmamızda yüksek yağlı yem ile beslenen grubumuzda östrus evrelerine bakılmaksızın prepuberte, puberte ve postpuberte dönemlerinde SPX immunohistokimyasal boyanma düzeyleri yüksek bulunmuştur. Aynı dönemde yüksek yağlı yem ve normal yağlı yem grupları karşılaştırıldığında, puberte ve postpuberte dönemlerinde anlamlı fark bulunmuştur.

İnsanlarda yapılan birkaç çalışma, obeziteyi serumdaki SPX'in azalması ile ilişkilendirmiştir. İnsanlarda, SPX'i kodlayan gen olan C12orf29, obez bireylerin adipoz dokusunda aşağı doğru regülasyon göstermiştir [55]. Bizim çalışmamızda postpuberte döneminde beyaz yağ dokusunda SPX protein ekspresyonu yüksek yağlı yem gruplarında normal gruba göre düşük gözlenmiştir.

Egzersiz yapılması yağ dokusunda adipokinlerin üretimini ve termojenezi artırır. Egzersiz, ayrıca yüksek yağlı yemle beslenme ile indüklenen obez farelerin adipoz dokularında insülin duyarlılığını arttıran speksin üretimini ve salgılanmasını arttırır. Hayvan deneylerinde zorunlu aktivitenin speksin salgısını artırmada etkili olduğu gösterilmiştir, ancak istemli aktivitenin speksin üzerindeki etkisi henüz incelenmemiştir [56]. Bizim çalışmamızda grupların

egzersiz aktivitelerine bakılmadı, öngörümüz daha hareketli olan gruplarda SPX ekspresyonunun hem doku düzeyinde hem de serum düzeyinde artmış olabileceğidir.

Yüksek yağlı yemdeki en yaygın doymuş yağ asidi olan palmitatın, iştahı düzenleyen nöropeptid Y hipotalamik nöron modelinde SPX, Galr2 ve Galr3 mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [55]. Bizim çalışmamızda hem serum SPX düzeyi hem de ovaryum dokusunda SPX protein ekspresyonu yağlı yem ile beslenen grupta normal yem ile beslenen gruba göre yüksek bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda ovaryum germinal epiteli, ovaryum korteksinin matriksini oluşturan stromal hücreler ve primordiyal foliküller, primer foliküller, sekonder foliküller, olgun foliküller ve korpus luteumda SPX'in immünreaktivitesi bulunmuştur. SPX sinyalleri granüloza hücrelerinin, teka hücrelerinin ve ovositlerin sitoplazmasında tanımlanmış olup antrum boşluğunda gözlenmemiştir. SPX boyaması, beyaz yağ dokusunda bulunan adipositlerin sitoplazmasında bulunmuş ancak lipit damlacığının kapladığı merkezi vakuolde bulunmamıştır [57]. Çalışmamızda literatüre benzer şekilde SPX pozitifliği izlendi.

Çalışmamız doku düzeyinde puberte ile ilişkili SPX immun ifadesinin ovaryum ve yağ dokusunda gösterildiği ilk çalışmadır. Ovaryum SPX immun boyanma ifadesi, literatürde teka hücrelerinde, granüloza lutein ve teka lutein hücrelerinin sitoplazmasında gösterilmiştir [16]. Bizim çalışmamızdaki bulgularda literatür ile uyumludur. Çalışmamızda doku düzeyinde SPX'in immun ifadesi puberte döneminde normal yem grubunda azalırken yüksek yağlı yem ile beslenen grupta artmış olarak izlendi.

Çalışmamızdaki kısıtlılıklar; puberte dönemi ve yüksek yağlı yem ile beslenme ilişkisi daha önceden bilinen kisspeptinin immun ifadesinin SPX' le birlikte gösterilememesi, PNG 21 infant dönemi sıçanların deneye eklenip erken juvenil dönemdeki serum SPX ve doku düzeyinde SPX ifadesinin bakılamamasıdır. Bu kısıtlılıkların ileriki çalışmalarda aşılması planlanmaktadır.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bulgularımıza göre;

Normal yem ve yüksek yağlı yem ile beslenen deney gruplarında,

- Beklendiği üzere dönemler arası sakrifikasyon ağırlıkları ve Δ Ağırlık / İlk ağırlık değerlerinde postpubertal döneme doğru artış gözlendi.
- Δ Ağırlık / İlk ağırlık değerlerinin, prepuberte ve puberte dönemlerinde normal yem ile beslenen grupta yüksek yağlı yem ile beslenen gruptan yüksek olduğu bulundu.
- Vajinal açıklık zamanlarında normal ve yüksek yağlı yem ile beslenen sıçanlar arasında anlamlı fark bulunmadı.
- Pubertede var olan fizyolojik insülin direncinin gösterilmesi amacıyla hesaplanan HOMA-ID, puberte döneminde prepuberte dönemine göre arttığı bulundu.
- Serum SPX düzeyi puberte döneminde azalmıştır.
- Serum KISS düzeyi puberte döneminde azalmıştır.
- Serum SPX ve KISS düzeyleri anlamlı korele bulunmuştur. Bu bulgu SPX' nin de KISS gibi puberte düzenlemesinde önemli bir belirteç olabileceğini göstermektedir.
- Normal yem ile beslenen sıçanlarda ovaryum dokusu SPX boyanma yoğunluğu puberte döneminde prepuberte dönemine göre azalmıştır, bu bulgu serum değerleri ile benzerdir.
- Normal yem ile beslenen sıçanlarda beyaz yağ dokusu SPX boyanma yoğunluğu puberte döneminde prepuberte dönemine göre azalmıştır, bu bulgu serum değerleri ile benzerdir.
- Yüksek yağlı yem gruplarında ovaryum ve beyaz yağ dokusunda SPX boyanma yoğunluğu prepuberte döneminden puberte dönemine geçişte anlamlı artış ve puberteden postpuberteye geçişte anlamlı azalma vardır. Bu bulgular normal yem ile beslenen sıçanlardan farklı olarak serum düzeyleri ile farklıydı.
- Bulgularımız leptin ve leptin reseptörlerinden ziyade speksinin puberte başlangıcının daha iyi bir göstergesi olabileceğini düşündürmüştür.

Bilgimiz dahilinde çalışmamız ile ilk kez SPX' nin dişi sıçanlarda pubertede serum ve doku düzeyinde anlamlı azaldığı gösterildi. Bu bulgu SPX' nin pubertede regülatör rolü olabileceğini düşündürdü. Sonuçlarımız insan pubertesinde SPX' nin regülatör rolü ile ilgili çalışmalara gereksinim olabileceğini desteklemektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Huang, A., T. Reinehr, and C.L. Roth, *Connections Between Obesity and Puberty: Invited by Manuel Tena-Sempere, Cordoba.* Curr Opin Endocr Metab Res, 2020. **14**: p. 160-168.

2. Stamou, M.I. and R. Balasubramanian, *Hypothalamic Ceramides and the Ovarian Sympathetic System: At the Crossroads of Obesity and Puberty.* Cell Metab, 2021. **33**(1): p. 6-8.

3. Cao, H., *Adipocytokines in obesity and metabolic disease.* J Endocrinol, 2014. **220**(2): p. T47-59.

4. Fang, P., et al., *Adipose tissue spexin in physical exercise and age-associated diseases.* Ageing Res Rev, 2022. **73**: p. 101509.

5. Roa, J. and A.E. Herbison, *Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice.* Endocrinology, 2012. **153**(11): p. 5587-99.

6. Tran, A., et al., *Spexin: Its role, regulation, and therapeutic potential in the hypothalamus.* Pharmacol Ther, 2022. **233**: p. 108033.

7. Moore K.L., P.T.V.N., Torchia M.G., *Before We Are Born*. 10 th ed.

8. Ross MH, P.W., *Histoloji: Konu Anlatımı ve Atlas*. 2014.

9. V.P., E., *di Fiore's Atlas of Histology*. 12 th ed.

10. Ovalle W.K., N.P.C., *Netter's Essential Histology* 2nd ed.

11. B.M., C., *Human Embryology and Devvelopmental Biology*. 7 ed.

12. T.W., S., *Langman's Medical Embryology*. 13 th ed.

13. A., C., *KÖK HÜCRE Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*. 2014.

14. Mirabeau, O., et al., *Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening.* Genome Res, 2007. **17**(3): p. 320-7.

15. Gu, L., et al., *Spexin peptide is expressed in human endocrine and epithelial tissues and reduced after glucose load in type 2 diabetes.* Peptides, 2015. **71**: p. 232-9.

16. Porzionato, A., et al., *Spexin expression in normal rat tissues.* J Histochem Cytochem, 2010. **58**(9): p. 825-37.

17. Lin, C.Y., et al., *Circulating Spexin Levels Negatively Correlate With Age, BMI, Fasting Glucose, and Triglycerides in Healthy Adult Women.* J Endocr Soc, 2018. **2**(5): p. 409-419.

18. Iwabu, M., et al., *Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1.* Nature, 2010. **464**(7293): p. 1313-9.

19. Fang, P., et al., *Galanin peptide family regulation of glucose metabolism.* Front Neuroendocrinol, 2020. **56**: p. 100801.

20. Fang, P., et al., *Development of metabolic dysfunction in mice lacking chemerin.* Mol Cell Endocrinol, 2021. **535**: p. 111369.

21. McIlwraith, E.K. and D.D. Belsham, *Hypothalamic reproductive neurons communicate through signal transduction to control reproduction.* Mol Cell Endocrinol, 2020. **518**: p. 110971.

22. Splett, C.L., et al., *Galanin enhancement of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone secretion in female rats is estrogen dependent.* Endocrinology, 2003. **144**(2): p. 484-90.

23. Cohen, Y., et al., *Spexin and a Novel Cichlid-Specific Spexin Paralog Both Inhibit FSH and LH Through a Specific Galanin Receptor (Galr2b) in Tilapia.* Front Endocrinol (Lausanne), 2020. **11**: p. 71.

24. Liu, Y., et al., *A novel neuropeptide in suppressing luteinizing hormone release in goldfish, Carassius auratus.* Mol Cell Endocrinol, 2013. **374**(1-2): p. 65-72.

25. H., C.W., *Goldman Cecil Medicine* 2023. 1591-1594.

26. Kaplowitz, P.B., *Link between body fat and the timing of puberty.* Pediatrics, 2008. **121 Suppl 3**: p. S208-17.

27. Tsutsui, K. and T. Ubuka, *GnIH Control of Feeding and Reproductive Behaviors.* Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 170.

28. Comninos, A.N., et al., *Kisspeptin signaling in the amygdala modulates reproductive hormone secretion.* Brain Struct Funct, 2016. **221**(4): p. 2035-47.

29. Gołyszny, M., E. Obuchowicz, and M. Zieliński, *Neuropeptides as regulators of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis activity and their putative roles in stress-induced fertility disorders.* Neuropeptides, 2022. **91**: p. 102216.

30. Ajayi, A.F. and R.E. Akhigbe, *Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update.* Fertil Res Pract, 2020. **6**: p. 5.

31. Emanuele, M.A., F. Wezeman, and N.V. Emanuele, *Alcohol's effects on female reproductive function.* Alcohol Res Health, 2002. **26**(4): p. 274-81.

32. Devillers, M.M., S. Mhaouty-Kodja, and C.J. Guigon, *Deciphering the Roles & Regulation of Estradiol Signaling during Female Mini-Puberty: Insights from Mouse Models.* Int J Mol Sci, 2022. **23**(22).

33. Zhou, Q., et al., *High-fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats.* Reprod Biol Endocrinol, 2014. **12**: p. 127.

34. Kochumon, S., et al., *Expression of Steroid Receptor RNA Activator 1 (SRA1) in the Adipose Tissue Is Associated with TLRs and IRFs in Diabesity.* Cells, 2022. **11**(24).

35. Bergmeyer, H.-U., *Methods of enzymatic analysis*. 2012: Elsevier.

36. Tietz, N.W., *Clinical guide to laboratory tests*, in *Clinical guide to laboratory tests*. 1995. p. 1096-1096.

37. Kelsey, M.M. and P.S. Zeitler, *Insulin Resistance of Puberty.* Curr Diab Rep, 2016. **16**(7): p. 64.

38. Teixeira, P.D.S., M.R. Tavares, and D. Jose, *Temporal characterization of the insulin resistance during puberty in mice.* Endocr Regul, 2021. **55**(1): p. 1-4.

39. Kwon, A., et al., *Serum kisspeptin levels mainly depend on ovarian expression of Kiss1 mRNA in female rats.* Front Physiol, 2022. **13**: p. 998446.

40. Kołodziejski, P.A., et al., *Serum levels of spexin and kisspeptin negatively correlate with obesity and insulin resistance in women.* Physiol Res, 2018. **67**(1): p. 45-56.

41. Hiney, J.K., et al., *Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty.* Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 3717-28.

42. Shimizu, F., et al., *Transition of leptin receptor expression during pubertal development in female rat pituitary.* Endocr J, 2008. **55**(1): p. 191-8.

43. Lie, M.E., A. Overgaard, and J.D. Mikkelsen, *Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats.* Reprod Biol, 2013. **13**(4): p. 298-308.

44. Yura, S., et al., *Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin.* J Clin Invest, 2000. **105**(6): p. 749-55.

45. Cheung, C.C., et al., *A reassessment of leptin's role in triggering the onset of puberty in the rat and mouse.* Neuroendocrinology, 2001. **74**(1): p. 12-21.

46. Chang, G.Q., et al., *Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity.* J Neurosci, 2008. **28**(46): p. 12107-19.

47. Moral, R., et al., *Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil provided from weaning advance sexual maturation and differentially modify susceptibility to mammary carcinogenesis in female rats.* Nutr Cancer, 2011. **63**(3): p. 410-20.

48. Sloboda, D.M., et al., *Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat.* PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6744.

49. Sánchez-Garrido, M.A., et al., *Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges.* Endocrinology, 2013. **154**(9): p. 3387-400.

50. Dourmashkin, J.T., et al., *Model for predicting and phenotyping at normal weight the long-term propensity for obesity in Sprague-Dawley rats.* Physiol Behav, 2006. **87**(4): p. 666-78.

51. Schreiber, A.L., et al., *The effects of high fat diet and estradiol on hypothalamic prepro-QRFP mRNA expression in female rats.* Neuropeptides, 2016. **58**: p. 103-9.

52. Kılınç Uğurlu, A., et al., *Effects of Blue Light on Puberty and Ovary in Female Rats.* J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2023. **15**(4): p. 365-374.

53. Castellano, J.M., et al., *Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation?* Endocrinology, 2006. **147**(10): p. 4852-62.

54. Shahed, A. and K.A. Young, *Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (Phodopus sungorus).* Mol Reprod Dev, 2009. **76**(5): p. 444-52.

55. Wang, L., et al., *Palmitate differentially regulates Spexin, and its receptors Galr2 and Galr3, in GnRH neurons through mechanisms involving PKC, MAPKs, and TLR4.* Mol Cell Endocrinol, 2020. **518**: p. 110991.

56. Fang, P., et al., *Exercise training rescues adipose tissue spexin expression and secretion in diet-induced obese mice.* Physiol Behav, 2022. **256**: p. 113958.

57. Wong, M.K.H., et al., *Mouse Spexin: (I) NMR Solution Structure, Docking Models for Receptor Binding, and Histological Expression at Tissue Level.* Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 681646.