

**Nesfatin-1 ve Kisspeptin Antagonisti P234'ün
Ovaryum Folikül Gelişimine Etkileri**

**Zafer ŞAHİN¹, Gökhan CÜCE², Mete ÖZCAN³,
Sinan CANPOLAT⁴, Zülfikare Işık SOLAK GÖRMÜŞ⁵,
Selim KUTLU⁶, Haluk KELEŞTİMUR⁷**

Öz

Amaç: Araştırmamızda nesfatin-1 ve kisspeptin reseptör antagonistinin sıçanlarda ovaryum foliküllerinin gelişim sayıları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda süten kesilmiş (21 günlük) dişi Sprague-Dawley yavru sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlara postnatal 23. günden 60. güne kadar nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234 santral [intraserebroventriküler (icv)] olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar tamamlandıktan sonra, hayvanlar diöstrus dönemindeyken deneyler sonlandırılmıştır. Elde edilen ovaryum örneklerinde folikül sayımı yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda uzun süreli kronik santral kisspeptin antagonisti p234 enjeksiyonunun ovaryum folikül gelişiminde bir düşüşe yol açtığı belirlendi. Benzer sonuç, nesfatin-1+p234 grubu için de geçerliydi.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgulara göre ovaryum folikül gelişiminde kisspeptin reseptör (Kiss1r) antagonistinin nesfatin-1'in etkisini azalttığı söylenebilir. Bu durum nesfatin-1'in kisspeptin/Kiss1r sinyalleşmesiyle etkileşimi olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte sadece p234'ün etkisine bağlı ovaryum folikül sayıları azalmış olabilir.

Anahtar kelimeler: Nesfatin-1, Kisspeptin antagonisti, Ovaryum, Folikül.

**Effects of Nesfatin-1 and Kisspeptin Antagonist p234 on Ovarian Follicle Development
Abstract**

Objective: In our study, it was aimed to determine the effects of nesfatin-1 and kisspeptin receptor antagonist on the developmental numbers of ovarian follicles in rats.

Material and Methods: In our study, weaned (21 days old) female Sprague-Dawley pubes rats were used in our study. From postnatal 23rd to 60th day, rats were injected with nesfatin-1, p234 and nesfatin-1+p234 centrally [intracerebroventricular (icv)]. When the injections were completed, the experiments were terminated while the animals were in diestrus. Follicle counts were made in the ovarian samples obtained.

¹ Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye

² Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

³ Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

⁴ Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

⁵ Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Fizyoloji, Konya, Türkiye

⁶ Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Fizyoloji, Konya, Türkiye

⁷ Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Yazışma Adresi: Zafer ŞAHİN, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 61080, Trabzon/Türkiye Tel: 0533 303 17 55 e-posta: zafersahin@ktu.edu.tr ORCID ID: 0000-0001-7982-7155

Geliş Tarihi: 28.04.2022 Kabul Tarihi: 24.07.2022

DOI: 10.17932/IAU.TFK.2018.008/tfk_v05i2003

Results: In our study, it was determined that long-term chronic injection of the central kisspeptin antagonist p234 caused a decrease in ovarian follicle development. Similar results were also valid for the nesfatin-1+p234 group.

Conclusion: According to our findings, it can be said that kisspeptin receptor (Kiss1r) antagonist nesfatin-1 reduces the effect of ovarian follicle development. This can be interpreted as nesfatin-1 interacting with kisspeptin/Kiss1r signaling. However, the number of ovarian follicles may have decreased due to the effect of only p234.

Key words: Nesfatin-1, Kisspeptin antagonist, Ovary, Follicle

Giriş

Nesfatin-1, Oh I ve arkadaşları tarafından 2006 yılında tanımlanan 82 aminoasitlik bir hormondur. Araştırmacılar, nucleobindin 2 (NUCB2) geni tarafından kodlanan bu anoreksijenik peptidi, tokluk ve yağa etki eden protein anlamında (NUCB2-encoded satiety and fat influencing protein) nesfatin olarak tanımlamışlardır (1). NUCB2/ Nesfatin-1, 396 aminoasitten oluşan ve 24 amino asitlik sinyal peptidi dizisi içeren bir protein yapısıdır (2,3) "type": "article-journal", "volume": "375"}, "uris": ["http://www.mendeley.com/documents/?uuid=5ceb36c2-93f7-42e6-92ac-699d1c3d9574"}], "mendeley": {"formattedCitation": "(2,3. NEFA/ NUCB2 proteininin fonksiyonun hücre sinyalleşmesi ve iştah metabolizması üzerine olduğu kabul edilmektedir. NUCB2 proteini Prohormon Convertase (PC) tarafından Nesfatin-1 (1-82 aminoasit), Nesfatin-2 (85-163 aminoasit) ve Nesfatin-3 (166-396 aminoasit) olarak 3 ürün şeklinde işlenmektedir (1).

NUCB2/Nesfatin-1 hipotalamusun iştahın kontrolü ile ilgili alanlarından olan paraventricüler nükleus (PVN), lateral hipotalamik alan (LHA), supraoptik nükleus (SON) ve arkuat nucleustaki (ARC) nöronlarda eksprese edilmektedir (1). Açlık durumunda sıçanlarda PVN'de NUCB2/ nesfatin-1 mRNA ekspresyonunun azaldığı

ve beslenme sonrası bu azalmanın eski haline döndüğü rapor edilmiştir. Nesfatin-1'in intraperitoneal enjeksiyonu erkek farelerde, karanlık faz boyunca, doz bağımlı şekilde gıda alımını baskılamaktadır (1). Nesfatin-1'in intraserebroventriküler (icv) infüzyonu ile doz bağımlı olarak 6 saat süresince gıda alımı azalmaktadır. Ancak, nesfatinin diğer segmentleri olan nesfatin-2, nesfatin-3 ve nesfatin-2+3'ün icv infüzyonunda iştah üzerinde bir etki oluşturmadığı belirlenmiştir (4) expression of c-Fos was significantly activated in the brainstem nucleus tractus solitarius (NTS).

Nesfatin-1'in ARC nöronlarında yer alması, bu hormonun üreme ile ilişkili fonksiyonlarda da etkili olabileceğine işaret etmektedir. Hem enerji dengesi hem de üremenin düzenlenmesi ile ilgili olarak, 2010 yılında yapılan bir çalışmada bu hormonun pubertal olgunlaşma sürecindeki dişi sıçanlara icv olarak as-MON (antisense morpholino oligonucleotides) infüzyonunun puberte başlangıç yaşını uzattığı, ovaryum ağırlığını azalttığı, LH düzeyini düşürdüğü ve hipotalamusta NUCB2 ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (5). Yine bir başka çalışmada insan, fare ve sıçan testislerinde ve sıçan ovaryumunda NUCB2 mRNA ekspresyonunun mevcudiyeti belirlenmiştir (6). Nesfatin-1'in henüz spesifik reseptörü/ reseptörleri tanımlanamamıştır. Bu duruma göre nesfatin-1'in nonspesifik olarak

farklı reseptörlerle etkileşme potansiyeli olduğu söylenebilir. Konuyla ilgili olarak yaptığımız bir çalışmada nesfatin-1'in gonadotropik aks aktivasyonundaki etkilerinin kisspeptin reseptör antagonisti ile azaltıldığı belirlenmiştir (7). Nesfatinin gonadotropinlerin uyarımı ile ilgili etkilerinin dışında ovaryumda folikül gelişimine olan etkileri ve bu muhtemel etkide kisspeptinin rolüne dair herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu sebeple çalışmamızda yavru döneminden erişkinliğe kadar santral olarak enjekte edilen nesfatinin sıçan ovaryumunda folikül sayılarına muhtemel etki ve kisspeptin reseptör (insanlarda KISS1R, hayvanlarda Kiss1r, önceden GPR54 olarak bilinirdi) antagonisti p234 ile etkileşiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda dişi Sprague-Dawley türü yavru sıçanlar kullanılmıştır. Deney grupları, Sham (kontrol), nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234 olarak dizayn edilmiştir. Çalışmada, her grupta 7'şer hayvan olacak şekilde, sıçanlar 21 günlük ortalama canlı ağırlıkları 40 ± 2 gram olan yavrular arasından rastgele dağılımla seçilmiştir. Deney süresince hayvanlar sabit ısı (21 ± 1 °C) ve 12 saat gece/12 saat gündüz ışık periyoduna sahip ortamda barındırılmıştır. Hem su hem de pellet yem ad libitum olarak verilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız bütün deneysel prosedürler Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Etik kurul no:2012/12-107) ve hayvanlara deney hayvanlarının bakımı ve kullanımına ilişkin ulusal ve uluslararası yasa ve politikalara uygun olarak davranılmıştır.

Postnatal 23. günde, yavrular ketamin/xylazine kombinasyonu (80/12 mg/

kg kas içi) ile anestezi altına alınmış ve sterotaksik koordinatlara göre (bregma noktasının 1.5 mm laterali ve 1mm posteriorü), icv enjeksiyon için sabit kanüller yerleştirilmiştir. Bu işlem için kafatası dental tur aletiyle delindikten sonra beynin sol lateral ventrikülüne (kafatası kemiğinden itibaren 4 mm) girilmiş ve kanüller kafatasına dental sement yardımıyla sabitlenmiştir. Postoperatif 2 gün süresince, cerrahi müdahale yapılan bütün hayvanlara, ağrı kesici olarak ibuprofen (1 mg/sıçan dozda) içme suyuna katılarak verilmiş ve hayvanların genel sağlık durumları gün içerisinde birkaç kez kontrol edilmiştir. Hayvanlara icv kanüller takıldığından itibaren, nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234 enjeksiyonları başlamış ve sıçanlar 60 günlük olana kadar devam edilmiştir. Yani icv enjeksiyonlar postnatal 23 günlük yavru döneminden postnatal 60 günlük erişkin dönemine kadar sürdürülmüştür. Her gün 10:00-12:00 saatleri arasında, nesfatin-1 25 pmol dozda ve p234 1 nmol dozda, toplam 5 µL hacimde, %0.9'luk NaCl içerisinde enjekte edilmiştir. Sham grubuna da aynı süre boyunca çözücü madde olan %0.9'luk NaCl aynı hacimde icv olarak enjekte edilmiştir. Sıçanlar 60 günlük olduklarında ketamin/xylazine ile anestezi altına alınarak, sakrifiye edilmiş ve ovaryumlar diseke edilmiştir.

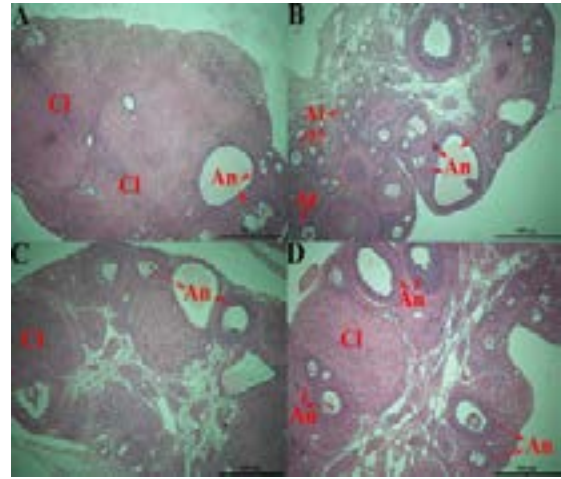
Histolojik analizler için, sol ovaryum her sıçandan hızla çıkarıldı ve etrafındaki yağ dokusundan temizlenerek diseke edildi. Folikül sayısı belirlenirken çok büyük veya küçük ovaryumlar dahil edilmedi. Toplanan ovaryumlar önce sabitlendi (%10 formaldehit) ve sonra parafine gömüldü. Sol yumurtalıkların µm seri kesitleri deparafinize edildi, yeniden hidratlandı ve histolojik analiz için hematoksilen ve

eoizin ile boyandı. Foliküller, küçük (bir tabaka yassı veya küboidal pregranüloza hücreleri), orta (lümensiz iki genişletilmiş granüloza hücresi tabakası), antral (>3 kat lümenli granüloza hücresi) foliküller olarak sınıflandırıldı. Foliküller her 10. kesitte bir sayıldı (8). Aynı kişi, çalışma boyunca grup bilgisi içermeyen kesitlerdeki folikülleri saydı ve böylece yanlı skorlama önlenmiş oldu. Ovaryum başına her kategorideki folikül sayısı, 10. kesitte sayılan foliküllerin toplamının 10 ile çarpılmasıyla elde edildi. Korpus luteum her 100 kesitte bir sayıldı.

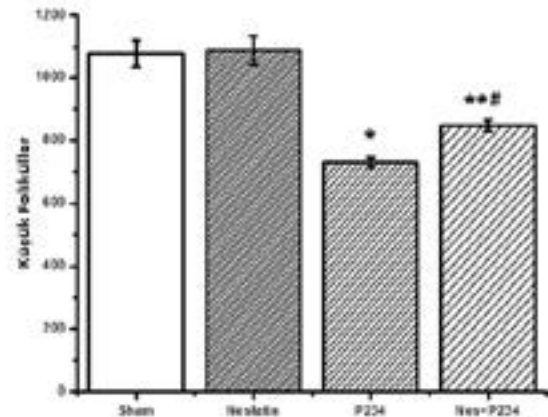
İstatistiksel analizler SPSS 12.0 ile grafikler ise Origin 8.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Bulguların analizi ve gruplar arası farklılıkların tespiti için one-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi kullanılmıştır. Bütün değerler; ortalama ve standart hata ($AO \pm SH$) olarak ifade edildi. Tüm analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Sham, nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234 gruplarına ait ovaryumların genel histolojik görünüşü Şekil 1'de sunulmuştur. Küçük folikül (small follicles) sayıları nesfatin (1076 ± 42.84) ve sham gruplarında (1087.2 ± 45.09) birbirine yakın değerdeydi. Küçük folikül sayıları hem p234 grubunda (730.6 ± 15.99) hem de nesfatin+p234 grubunda (848.2 ± 18.31) sham grubuna kıyasla önemli düzeyde daha düşüktü (sırasıyla $p < 0.001$ ve $p < 0.01$). Nesfatin-1 grubu ile karşılaştırıldığında ise nesfatin-1+p234 grubunda küçük folikül sayısı anlamlı derecede daha düşüktü. ($p < 0.01$, Şekil 2).

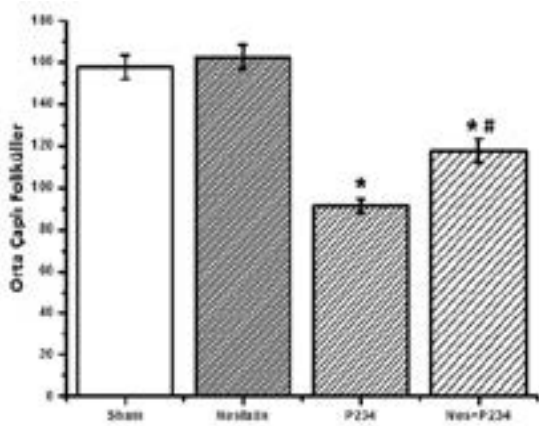


Şekil 1. Sham (A), p234 (B), nesfatin-1+p234 (C) ve nesfatin-1 (D) gruplarının hematoksisilen-eozin (H&E) ile boyanmış sol ovaryum kesitlerinde farklı folikül tipleri görülmektedir. CL, korpus luteum; An, antral folikül; At, atretik folikül.

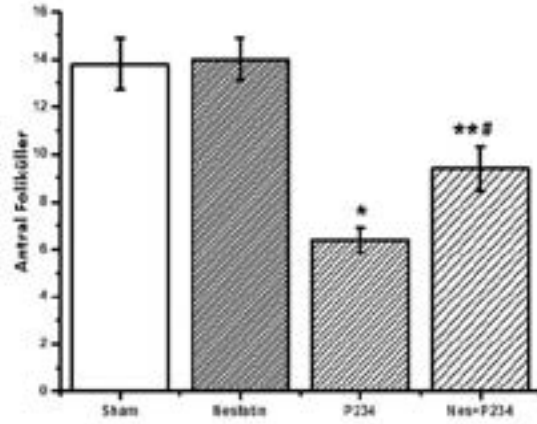


Şekil 2. İcv olarak enjekte edilen nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234'ün küçük foliküllerin gelişimine etkileri. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; sham grubuna kıyasla, # $p < 0.01$; nesfatin grubuna kıyasla (one-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi),

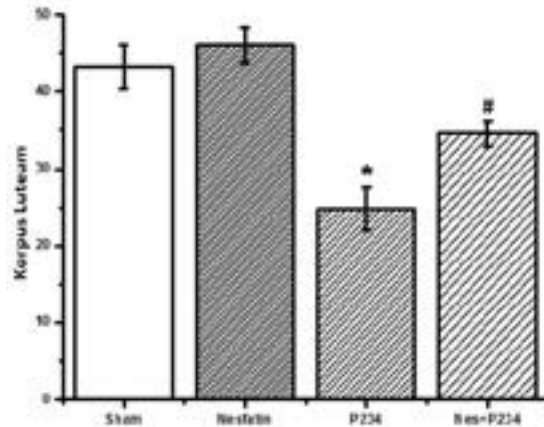
Nes, nesfatin. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da nesfatin grubunda (162.6 ± 5.94) sham grubuna (158 ± 42) kıyasla orta folikül (medium follicles) sayısı daha fazlaydı. Orta folikül sayılarının p234 grubunda (91.4 ± 3.36) sham grubuna kıyasla önemli derecede daha az olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Nesfatin grubuyla kıyaslandığında ise nesfatin+p234 grubunun folikül sayısının (117.8 ± 5.99) anlamlı şekilde daha düşük olduğu görüldü ($p < 0.001$, Şekil 3).



Şekil 3. İcv olarak enjekte edilen nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234'ün orta foliküllerin gelişimine etkileri. * $p < 0.001$; sham grubuna kıyasla, # $p < 0.001$; nesfatin grubuna kıyasla (one-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi), Nes, nesfatin. Nesfatin uygulanan grubun (14 ± 0.89) antral folikül sayıları sham grubu değerine (13.8 ± 1.07) yakındı (Şekil 4). Bununla birlikte antral folikül sayısı sham grubuna kıyasla, p234 (6.4 ± 0.51) ve nesfatin+p234 (9.4 ± 0.93) gruplarında anlamlı şekilde daha düşüktü (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.05$). Nesfatin grubuna kıyaslandığında ise nesfatin+p234 grubunda antral folikül sayısı anlamlı şekilde daha düşüktü ($p < 0.01$, Şekil 4).

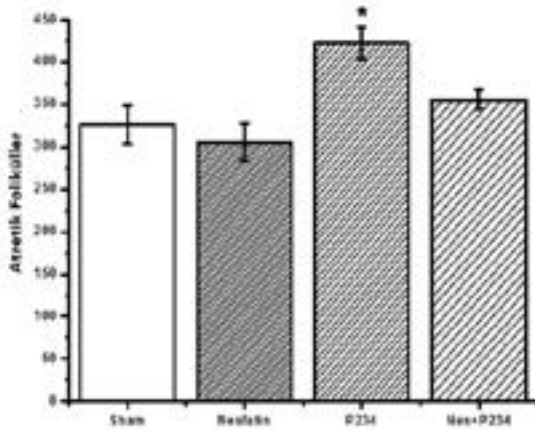


Şekil 4. İcv olarak enjekte edilen nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234'ün antral foliküllerin gelişimine etkileri. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$; sham grubuna kıyasla, # $p < 0.01$; nesfatin grubuna kıyasla (one-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi), Nes, nesfatin. Korpus luteum sayısının p234 grubunda (24.8 ± 2.76) sham grubuna (43.2 ± 2.84) kıyasla anlamlı şekilde daha az olduğu belirlendi ($p < 0.001$, Şekil 5). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da nesfatin grubunda (46 ± 2.35) korpus luteum sayısı sham grubuna kıyasla daha yüksekti. Nesfatin-1 grubuna kıyasla, nesfatin-1+p234 grubunda (34.6 ± 1.69) korpus luteum sayısının daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$).



Şekil 5. İcv olarak enjekte edilen nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234'ün korpus luteum

gelişimine etkileri. $*p<0.001$; sham grubuna kıyasla, $\#p<0.05$; nesfatin grubuna kıyasla (one-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi), Nes, nesfatin. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da atretik folikül (atretic follicles) sayısı sham grubuna (326.2 ± 22.65) kıyasla nesfatin-1 grubunda (305.6 ± 21.69) daha düşük, nesfatin-1+p234 grubunda (355.8 ± 11.65) daha yüksekti (Şekil 6). Sham grubuna kıyasla p234 grubunda (421.8 ± 19.37) atretik folikül sayısı önemli derecede daha fazlaydı ($p<0.05$).



Şekil 6. İcv olarak enjekte edilen nesfatin-1, p234 ve nesfatin-1+p234'ün atretik folikül gelişimine etkileri. $*p<0.05$; sham grubuna kıyasla (one-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi), Nes, nesfatin.

Tartışma

Çalışmamızda uzun süreli kronik santral kisspeptin antagonisti p234 enjeksiyonunun ovaryum folikül gelişiminde bir düşüşe yol açtığı belirlendi. Benzer sonuç nesfatin-1+p234 grubu için de geçerliydi. 2010 yılında, dişi sıçanlarda puberte öncesi dönem ve puberte evresinde hipotalamusta NUCB2/nesfatin-1 ekspresyonunun artış gösterdiğinin belirlenmesiyle birlikte (6), dikkatler

bu hormonun üreme fizyolojisindeki muhtemel rolüne odaklanmıştır. Nesfatin-1'in hipotalamusun PVN, ARC, LHA ve SON gibi nükleuslarında ekspresse edildiği rapor edilmiştir (1). İlk dönemlerde bu hormonun anoreksijenik etkisi ortaya konulduğu için ve söz konusu hipotalamik nükleusların hem iştah hem de enerji regülasyonu ile ilişkili alanlar olmasından dolayı araştırmalar ağırlıklı olarak bu yönde sürdürülmüştür. Özellikle ARC nükleus olmak üzere, dorsomedial nükleus (DMN) ve diğer hipotalamik nükleusların doğrudan veya dolaylı olarak üreme fonksiyonunun regülasyonunda rol alan alanlar olmasından dolayı üreme fizyolojisi ve nesfatin-1 arasındaki ilişki gün geçtikçe daha yoğun şekilde irdelenmektedir. Bu durumla ilişkili olarak, prepubertal dönemden puberte evresine geçiş sürecinde PVN, SON ve LHA nükleuslarında bu hormonun ekspresyon düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Buna karşın, dişilerde puberte öncesi postnatal 20. günde belli düzeyde ARC ve DMN nükleuslarda NUCB2/nesfatin-1 mRNA ekspresyonu mevcudiyetine rağmen, postnatal 35. gün olan peripubertal dönemde ise ekspresyon analizlerinden birbirini destekleyen veriler elde edilememesi (1) ilginç bir durumdur. Dişi sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, puberte öncesi periyotta icv olarak anti-NUCB2 as-MON infüzyonu sonrası puberte başlangıç yaşının geciktiği, ovaryum ağırlığının azaldığı, LH düzeyinin düştüğü ve hipotalamik NUCB2/ Nesfatin-1 ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir (6). Bütün bu sonuçlar, nesfatin-1'in üreme ve ovaryum aktivitesi üzerinde bir rolünün olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızda nesfatin-1 grubunun folikül sayıları kontrol grubu değerleriyle aynı seviyede olduğu tespit edildi. İlginc bir

bulgu olarak, nesfatin-1+p234 grubunda nesfatin-1 grubuna kıyasla folikül gelişim sayılarının daha düşük düzeyde olduğu belirlendi. Nesfatin-1'in tek başına uygulandığında elde edilen folikül gelişim sayıları, nesfatin-1 ve kisspeptin antagonisti p234'ün birlikte uygulandığı grupta geçerli değildi. Bu sonuç nesfatin-1'in folikül gelişimi üzerine etkisinin kisspeptin antagonisti ile azaltıldığını göstermektedir.

Konuyla ilgili olarak, ovaryum aktivitesi üzerine nesfatin-1 ve kisspeptin etkileşimine dair bir çalışma mevcut değildir. Bir çalışmada hipotalamusun farklı bölgelerinde NUCB2/Nesfatin-1 ile mammalian target of rapamycin'in (mTOR) lokalizasyonunda yakın yerleşimin söz konusu olduğu belirlenmiştir (9). mTOR ile ilgili olarak, bu molekül kisspeptin gen (Kiss1) ekspresyonunda muhtemel regülatörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (10). Nesfatin-1 ile oluşan etkinin kisspeptin reseptör antagonisti olan p234 ile azaltılabilmesi, kisspeptin reseptörünün mevcut olduğu alanlarda nesfatin-1'in etki oluşturabilme potansiyeline sahip olmasıyla ilişkili olabilir. Bilindiği üzere kisspeptin hormonu GnRH'ı ve gonadotropin sekresyonunu güçlü şekilde aktive etmektedir. Kisspeptin gen mutasyonu (11,12) ya da Kiss1r defekti oluşturulmuş (11,13-16) {"id": "ITEM-3", "itemData": {"DOI": "10.1210/en.2007-0078", "ISSN": "0013-7227", "abstract": "The G protein-coupled receptor Gpr54 and its ligand metastin (derived from the Kiss1 gene product kisspeptin transgenik farelerde puberte görülmemektedir. Bu hayvanlarda gonadal büyümede yetersizlik ve düşük gonadotropin seviyelerine bağlı olarak infertilite şekillenmektedir. Kisspeptin, farklı fizyolojik koşullara bağlı olarak çeşitli ovaryum ve diğer doku tipleri

üzerinde otokrin/parakrin bir şekilde doğrudan etkilerini gösterebilir. Üreme fonksiyonu ile ilgili olarak, çok sayıda çalışmada, ovaryumda ve kadın genital kanalında insanlar dahil çeşitli türler arasında kisspeptin/KISSR sisteminin fonksiyonel önemine işaret edilmiştir (17-19). Ayrıca, son dönemlerde ovaryumlarda lokal olarak üretilen Kisspeptin/KISSR'nin bir dizi fizyolojik ve patolojik aktiviteye doğrudan katıldığı ileri sürülmektedir (20). Çalışmamızda atretik folikül sayısı kisspeptin antagonisti p234 grubunda daha fazlaydı. Küçük, orta ve antral foliküller ile korpus luteum sayısı p234 grubunda daha düşüktü. Bu sonuçlar kisspeptinin ovaryum folikül gelişimini desteklediğini göstermektedir. İlginç bir sonuç olarak, çalışmamızda nesfatin-1+p234 grubunda küçük, orta ve antral foliküllerinin sayısı sham grubuna kıyasla daha azdı. Ayrıca nesfatin grubuna kıyasla, küçük, orta ve antral foliküller ile korpus luteum sayısının nesfatin-1+p234 grubunda daha düşük olduğu belirlendi. Bu sonuç nesfatin-1'in ovaryum folikülleri üzerine etkisinin kisspeptin antagonisti ile modüle edilebildiğine işaret etmektedir. Konuyla ilgili daha önceki çalışmamızda kisspeptin antagonisti p234'ün nesfatin-1 ile indüklenen LH (Lüteinleştirici hormon) artışını blokladığı tespit edilmiştir (7). Bu durum nesfatin-1'in kisspeptin/Kiss1r sinyalleşmesi ile etkileştigiğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, kisspeptin antagonisti p234'ün tek başına uygulandığında folikülleri azaltıcı etkisinin kombinasyon grubunda da geçerli olabileceği unutulmamalıdır. Nitekim nesfatin-1'in ovaryum foliküllerinin gelişim sayıları üzerine bariz bir etkisi söz konusu değildir. Bu sebeple, zayıf bir ihtimal dahi olsa, sadece p234'e bağlı etkiyle nesfatin-1+p234 grubunda folikül sayılarında azalma meydana gelmiş olabilir.

Sonuç

Araştırmamızda uzun süreli kronik santral kisspeptin antagonisti p234 enjeksiyonunun ovaryumda küçük, orta ve antral foliküller ile korpus luteum gelişiminde bir azalmaya yol açtığı belirlendi. Benzer sonuç nesfatin-1+p234 grubu için de geçerliydi. Elde ettiğimiz bulgulara göre ovaryum folikül gelişiminde kisspeptin reseptör (Kiss1r) antagonisinin nesfatin-1'in etkisini azalttığı söylenebilir. Bu durum nesfatin-1'in kisspeptin/Kiss1r sinyalleşmesiyle etkileşimi olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bununla birlikte, sadece p234'ün etkisine bağlı ovaryum folikül sayılarının bir azalma olması da mümkündür.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bulunmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 2006;443(7112): 709–712. <https://doi.org/10.1038/nature05162>.
2. Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992;187(1): 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)81503-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81503-7).
3. Barnikol-Watanabe S, Groß NA, Götz H, et al. Human Protein NEFA, a Novel DNA Binding / EF-Hand / Leucine Zipper Protein. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the cDNA, Isolation and Characterization of the Protein. *Biological*

Chemistry Hoppe-Seyler. 1994;375(8): 497–512. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1994.375.8.497>.

4. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: The leptin-independent mechanism. *Endocrinology*. 2009;150(2): 662–671. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0598>.
5. García-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F, Tena-Sempere M. Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010;45(5): 281–290. <https://doi.org/10.1677/JME-10-0059>.
6. Garcia-Galiano D, Navarro VM, Roa J, et al. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *Journal of Neuroscience*. 2010;30(23): 7783–7792. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5828-09.2010>.
7. Kelestimur H, Sahin Z, Bulmus O, et al. Kisspeptin antagonist, peptide 234, blocks both kisspeptin-10 and nesfatin-1-induced luteinizing hormone release in the female rats. *Journal of Sexual Medicine*. 2015;12: 287.
8. Tarumi W, Suzuki N, Takahashi N, et al. Ovarian toxicity of paclitaxel and effect on fertility in the rat. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2009;35(3): 414–420. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2009.01023.x>.
9. Inhoff T, Stengel A, Peter L, et al. Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats.

- Peptides*. 2010;31(2): 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.11.024>.
10. Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, et al. The Mammalian Target of Rapamycin as Novel Central Regulator of Puberty Onset via Modulation of Hypothalamic Kiss1 System. *Endocrinology*. 2009;150(11): 5016–5026. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0096>.
 11. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;312(4): 1357–1363. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.066>.
 12. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JPC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(25): 10714–10719. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704114104>.
 13. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(17): 1614–1627. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>.
 14. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, et al. Kiss1 $-/-$ Mice Exhibit More Variable Hypogonadism than Gpr54 $-/-$ Mice. *Endocrinology*. 2007;148(10): 4927–4936. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0078>.
 15. Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, et al. The Role of Kisspeptin GPR54 Signaling in the Tonic Regulation and Surge Release of Gonadotropin-Releasing Hormone/Luteinizing Hormone. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(44): 12088–12095. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2748-07.2007>.
 16. Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, et al. The Kisspeptin Receptor GPR54 Is Required for Sexual Differentiation of the Brain and Behavior. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(33): 8826–8835. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2099-07.2007>.
 17. Shahed A, Young KA. Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Molecular Reproduction and Development*. 2009;76(5): 444–452. <https://doi.org/10.1002/mrd.20972>.
 18. Cejudo Roman A, Pinto FM, Dorta I, et al. Analysis of the expression of neurokinin B, kisspeptin, and their cognate receptors NK3R and KISS1R in the human female genital tract. *Fertility and Sterility*. 2012;97(5): 1213–1219. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.021>.
 19. Zhang P, Tang M, Zhong T, et al. Expression and Function of Kisspeptin during Mouse Decidualization. Wang H (ed.) *PLoS ONE*. 2014;9(5): e97647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097647>.
 20. Hu KL, Zhao H, Chang HM, et al. Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00365>.