



T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**FARKLI STRES MODELLERİNDE NESFATİN-1 VE
NÖRONOSTATİN NÖRONLARINDAKİ AKTİVASYONUN VE
GLUTAMATERJİK SİSTEM ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI**

GÜLÇİN EKİZCELİ

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2019





**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**



**FARKLI STRES MODELLERİNDE NESFATİN-1 VE
NÖRONOSTATİN NÖRONLARINDAKİ AKTİVASYONUN VE
GLUTAMATERJİK SİSTEM ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK
TEKNİKLERLE ARAŞTIRILMASI**

Gülçin EKİZCELİ

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR

BURSA-2019

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “**Farklı stres modellerinde nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonun ve glutamaterjik sistem etkilerinin histolojik tekniklerle araştırılması**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Gülçin EKİZCELİ

Tarih ve İmza

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Gülçin EKİZCELİ tarafından hazırlanan “**Farklı stres modellerinde nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonun ve glutamaterjik sistem etkilerinin histolojik tekniklerle araştırılması**” konulu doktora tezi 02/08/2019 günü, 11:00-13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Özhan EYİGÖR	
Üye	Prof. Dr. Zehra MİNBAY	
Üye	Doç. Dr. İlker M KAFA	
Üye	Prof. Dr. V. Sevinç İNAN	
Üye	Dr. Öğrt. Üyesi F. Bahar SUNAY	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

02/08/2019

Adı Soyadı: Gülçin EKİZCELİ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stres moleküllerini protein düzeyinde sentezleyip sentezlemediğinin araştırılması. Ayrıca farklı akut stres modellerinde nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonun ve glutamaterjik sistem etkilerinin histolojik tekniklerle araştırılması.

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	□	
Dış Kapak Sayfası	■	□	
İç Kapak Sayfası	■	□	
Kabul Onay Sayfası	■	□	
Sayfa Düzeni	■	□	
İçindekiler Sayfası	■	□	
Yazı Karakteri	■	□	
Satır Aralıkları	■	□	
Başlıklar	■	□	
Sayfa Numaraları	■	□	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	□	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	□	
Kaynaklar	■	□	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ve ONAY	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Stres	6
2.2. Hipotalamik Hipofizer Adrenal Aks.....	9
2.2.1. Paraventriküler Nukleus	11
2.2.2. Kortikotropin Salverici Faktör.....	13
2.2.3. Kortikotropin Salverici Faktör Reseptörleri.....	16
2.2.4. Hipofiz Bezi.....	17
2.2.5. Adrenokortikotropik Hormon	18
2.2.6. Adrenal Bez	19
2.2.7. Glukokortikoidler	20
2.2.8. Kortikosteroid Reseptörleri	23
2.3. Glutamaterjik Sistem.....	27
2.3.1. İyonotropik Glutamat Reseptörleri.....	28
2.3.2. Metabotropik Glutamat Reseptörleri	29
2.4. Merkezi Melanokortin Sistemi ve Besin Alımı Düzenlenimi.....	30
2.5. Nesfatin-1.....	31
2.5.1. Nesfatin-1 ve Besin Alımı Düzenlenmesi.....	32
2.5.2. Nesfatin-1 ve Stres.....	32
2.6. Nöronostatin.....	37
2.6.1. Nöronostatin'in Genel Özellikleri.....	37
2.7. Nöronal Aktivasyon Belirteçleri.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Deney Hayvanları.....	40
3.2. Beyin Dokularının Eldesi.....	40
3.3. Stres Deney Grupları.....	41
3.3.1. Stres Kontrol Grubu	42
3.3.2. İmmobilizasyon Stresi Grubu	42
3.3.3. Yüzme Stresi Grubu	43
3.3.4. Akut İnflamatuvar Stres Grubu	44
3.4. Glutamat Reseptör Antagonisti Uygulamaları.....	45
3.4.1. NMDA Reseptör Antagonisti MK-801 Uygulaması.....	45
3.4.2. Non-NMDA Reseptör Antagonisti CNQX Uygulaması.....	45
3.5. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Saklanması.....	46
3.6. İmmünohistokimyasal İşaretleme.....	46
3.6.1. Antikorların Optimizasyonu	46
3.7. Stres Moleküllerinin Dağılımın İncelenmesi.....	49

3.7.1. CRFR-1 Dağılımının İncelenmesi.....	50
3.7.1.2. Nöronostatin/ CRFR-1 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü	51
3.7.2. CRFR-2 Dağılımının İncelenmesi.....	52
3.7.2.1. Nesfatin-1/ CRFR-2 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü	52
3.7.2.2. Nöronostatin/ CRFR-2 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü	53
3.7.3. GR Dağılımının İncelenmesi	54
3.7.3.1. Nesfatin-1/ GR İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü.....	54
3.7.3.2. Nöronostatin/ GR İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü....	55
3.7.4. MR Dağılımının İncelenmesi.....	57
3.7.4.1. Nesfatin-1/ MR İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü	57
3.8. Stres Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi	58
3.8.1. Nesfatin-1/ c-Fos İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü.....	58
3.8.2. Nöronostatin/ pSTAT5 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü	59
3.9. Hücre Sayımı.....	60
3.10. İstatistiksel Değerlendirme.....	61
4. BULGULAR	62
4.1. Nesfatin Nöronları ve Stres Molekülleri ile Yapılan İmmünohistokimyasal İşaretlemler.....	62
4.1.1. Nesfatin-1 Nöronlarında CRFR-1 Ekspresyon Değerlendirmesi	63
4.1.2. Nesfatin-1 Nöronlarında CRFR-2 Ekspresyon Değerlendirmesi	64
4.1.4. Nesfatin-1 Nöronlarında GR Ekspresyon Değerlendirmesi.....	65
4.1.5. Nesfatin-1 Nöronlarında MR Ekspresyon Değerlendirmesi.....	68
4.2. Nöronostatin Nöronları ve Stres Molekülleri ile Yapılan İmmünohistokimyasal İşaretlemler.....	69
4.2.1. Nöronostatin Nöronlarında GR Ekspresyon Değerlendirmesi.....	70
4.3. Stresin Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi..	72
4.3.1.1. İmmobilizasyon Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Paraventriküler Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi	73
4.3.1.2. İmmobilizasyon Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Arkuat Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi	76
4.3.2.1. Yüzme Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Paraventriküler Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi	79
4.3.2.2. Yüzme Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Arkuat Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi	82
4.3.3. Akut Enflamatuvar Stresin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Supraoptik Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi	85
4.4. Stresin Nöronostatin Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi	91
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	98
6. KAYNAKLAR	108

7. SİMGELER VE KISALTMALAR	137
8. EKLER.....	140
9. TEŞEKKÜR	141
10. ÖZGEÇMİŞ.....	142

TÜRKÇE ÖZET

“Farklı stres modellerinde nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonun ve glutamaterjik sistem etkilerinin histolojik tekniklerle araştırılması.”

Çalışmada, besin alımını baskılayan nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stresin neden olduğu sinyalleri algılama mekanizmaları, stresin söz konusu nöronlardaki olası aktive edici etkisi ve bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin rolü araştırılmıştır.

Strese bağlı sinyallerin algılanmasının gösterilmesi amacıyla, ilgili nöronlarda glukokortikoid (GR), mineralokortikoid (MR) ile kortikotropin-saliverici faktör reseptör (CRFR) proteinleri ve nöronlar üzerindeki sinir sonlanmalarında kortikotropin-saliverici faktör ekspresyonları değerlendirilmiştir. Nesfatin-1 nöronlarının periferik stres sinyallerini algılayacak GR, MR ve CRFR proteinlerini, nöronostatin nöronlarının ise sadece GR proteinini eksprese ettiği belirlenmiştir. Bu veriler, periferik stres sinyallerinin direkt olarak bu nöronlara ulaşabildiğini göstermektedir.

Farklı tipte stres uygulamalarının (hareketsizlik, yüzmeye ve akut enflamatuvar stres) nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarındaki aktive edici etkisinin araştırıldığı ikili immünohistokimyal boyamalarla, immobilizasyon ve yüzmeye stresi sonrasında özellikle paraventriküler ve arkuat çekirdeklerdeki nesfatin-1 nöronlarında aktivasyonunun anlamlı olarak arttırdığı; ancak, nöronostatin nöronlarında değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Akut enflamatuvar stresin ise sadece supraoptik çekirdekteki nesfatin-1 nöronlarını aktive ettiği belirlenmiştir.

Strese bağlı oluşan aktivasyonda glutamaterjik sistemin etkinliği, stres öncesi glutamat reseptör antagonistleri uygulanan deneklerde incelenmiş ve aktivasyonu anlamlı bir şekilde baskılandığını göstermiştir. Bu sonuç, nesfatin-1 nöronlarının strese bağlı aktivasyonunda, glutamaterjik nörotransmitter olarak kullanan üst merkezlerin de rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak tez çalışmalarımızda, besin alımının baskılanmasında rol alan nöronların periferik stres sinyallerini algılayabilecek reseptör proteinlerini sentezlediği, akut stres durumlarında besin alımının azalmasına nesfatin-1 nöronlarının aracılık edebileceği ve bu nöronların strese yanıtında glutamaterjik sistemin önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu verilerin, strese bağlı beslenme bozukluklarının moleküler mekanizmasının ortaya konmasında ve bu bozuklukların tedavisine yönelik deneysel ve klinik çalışmaların planlanmasında yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Besin alımı, Nesfatin-1, Stres, Hareketsizlik, Yüzmeye stresi, LPS, Akut Stres.

İNGİLİZCE ÖZET

“Assessment of the activation of nesfatin-1 and neuronostatin neurons and the effect of glutamatergic system in different stress models by histological techniques.”

In this study, the perception mechanisms of the nesfatin-1 and neuronostatin neurons that suppress nutrient intake for stress signals, the possible activating effect of stress on these neurons and the role of the glutamatergic system in this activation were investigated.

In order to demonstrate the perception of stress-related signals, glucocorticoid (GR), mineralocorticoid (MR) and corticotrophin-releasing factor receptor (CRFR) proteins were evaluated and corticotropin-releasing factor expressions were evaluated in nerve endings on neurons. The results of these studies showed that the nesfatin-1 neurons express GR and MR proteins in order to receive peripheral stress signals. It was also demonstrated that the nesfatin-1 neurons possess CRF receptors. Neuronostatin neurons express only GR protein.

The effect of different types of stress applications (immobilization, swimming forced stress, acute inflammatory stress) on nesfatin-1 and neuronostatin neurons was investigated by dual immunohistochemical staining, it was found that after immobilization and swimming stress, activation of nesfatin-1 neurons in paraventricular and arcuate nuclei increased significantly but there was no change in neuronostatin neurons. In addition, inflammatory stress effected the activation of the nesfatin-1 neurons only localized in the supraoptic nuclei.

The effectiveness of the glutamatergic system in stress-induced activation was examined in subjects treated with pre-stress glutamate receptor antagonists and showed that its activation was significantly suppressed. It is suggested that the glutamatergic system and the glutamate receptors play a role in the activation of nesfatin-1 neurons after receiving stress signals and that the higher centers in the brain which use the glutamate as a neurotransmitter participate in this regulatory mechanism.

In conclusion in this study we were able to determine that, the neurons which suppress the food intake synthesize the receptor proteins in order to receive the peripheral stress signals, nesfatin-1 neurons can participate in the attenuation of food intake during stress and the glutamatergic system plays an important role in the activation of nesfatin-1 neurons following acute stress. It is suggested that these new findings will shed light on planning clinical studies in order to understand the molecular mechanisms of the eating disorders during stress as well as the treatment of such disorders.

Key Words: Food intake, Nesfatin-1, Stress, Restrain, Swimming forced stress, LPS, Acute stress.

1. GİRİŞ

Strese maruz kalan organizmalarda çok çeşitli metabolik ve davranışsal değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Stres düzeyi ile ilişkili olarak patolojik boyuta gelen akut veya kronik stres, organizmada başlıca endokrin sistem ve merkezi sinir sistemi olmak üzere besin alımını da içeren birçok sistemi etkileyerek vücudun iç dengesi denilen homeostazi değiştirmektedir (Charmandari ve ark., 2005).

Vücutta homeostazın strese karşı korunmasında en önemli mekanizma hipotalamik-hipofizier-adrenal aks olarak adlandırılan sistemin aktivasyonudur. Fizyolojik ya da psikolojik stressörlerin patolojik boyuta gelmeden HPA aksı aktivasyonu ile birlikte genel dolaşıma salınan kortizol savunma mekanizmalarını harekete geçirmektedir (Oyola ve Handa, 2017; Selye, 1950).

Çalışmamızda deney hayvanlarında fizyolojik, psikolojik ve fizyolojik-psikolojik akut stres modelleri ile bu stressörlere organizmanın verdiği yanıttan etkilenen besin alımı mekanizmalarının ve bu mekanizmalar üzerinde merkezi sinir sisteminin ana eksitator sinyal yolağı olan glutamaterjik sistemin etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla; son yıllarda araştırmalarda sıklıkla yer alan besin alımını inhibe ettiği bilinen ve tokluk molekülü olarak adlandırılan nesfatin-1 ve besin alımını inhibe ettiğine dair veriler bulunan sahip olan nöronostatin nöronları ele alınmıştır. Çalışmamızda ayrıca cinsiyete bağlı olası farklılıkların belirlenebilmesi amacıyla dişi ve erkek denekler kullanılmıştır.

Söz konusu nöronların stresten etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi ve strese bağlı olarak oluşan sinyalleri algılama mekanizmasının araştırılması amacıyla çalışmamızda 2 hipotez kurulmuştur:

1. Nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarında periferik ve/veya merkezi stres sinyali moleküllerini bağlayacak reseptörler sentezlenmektedir.

2. Stres sonrası nesfatin-1 ve nöronostatin nöronları aktive olurlar ve bu aktivasyonda glutamaterjik sistem rol oynar.

Çalışmamızda birinci hipotezin test edilebilmesi için üç hedef öngörülmüştür:

Hedef 1: Nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarında glukokortikoid ve mineralokortikoid reseptör (GR ve MR) protein ekspresyonunun belirlenmesi.

Hedef 2: Nesfatin-1 ve nöronostatin nöronları üzerinde kortikotropin-releasing hormon (CRH, CRF) nöron sonlanmalarının gösterilmesi.

Hedef 3: Nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarında CRF reseptör ekspresyonunun araştırılması.

İkinci hipotezin test edilebilmesi için ise iki hedef öngörülmüştür:

Hedef 4: Farklı stres modellerinde nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonun ve modele bağlı farklılıkların incelenmesi.

Hedef 5: Stres sonrası nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarında görülen aktivasyonun baskılanmasında, glutamat reseptör antagonistlerinin etkilerinin gösterilmesi.

Birinci hipotezimizin test edilmesi amacıyla, ilk olarak nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarında GR ve MR ekspresyonunun varlığı araştırılmıştır. Bu hipoteze ait diğer hedefimizle ilgili olarak yapılan çalışmalarda nesfatin-1 nöronlarında kortikotropin salıverici faktöre (CRF) ait reseptörlerin varlığı immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Ayrıca bu nöronlar üzerindeki aksonal sonlanmalarda CRF immünoreaktivitesi gösterilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızın ikinci hipotezinin test edilmesine yönelik olarak besin alımını etkilediği bilinen nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stresten etkilenip etkilenmediği ve eğer etkileniyorsa bu etkileşimde glutamaterjik sistemin etkisi incelenmiştir. Çalışmada deney hayvanlarında fizyolojik stres modeli olarak lipopolisakkarit enjeksiyonu ile oluşturulan akut enflamatuvar stres, psikolojik stres modeli olarak immobilizasyon stresi ve fizyolojik-psikolojik stres modeli

olarak da zorla yüzdürme testi olarak da adlandırılan yüzme stresi modelleri kullanılmıştır.

Bu araştırmalar sonucunda nesfatin-1 nöronlarının stres moleküllerinin tamamı ile ko-ekspresyon belirlenmesine karşın nöronostatin nöronlarının yalnızca GR ile ko-ekspresyon gösterdiği saptanmıştır.

Besin alımı, merkezi ve periferik sinyal mekanizmalarıyla kontrol edilen başlıca merkezi sinir sisteminden dolaşıma salınan nöropeptitler ile davranışa dönüşen kompleks fizyolojik bir davranıştır. Besin alımı ile ilgili hem insanlarda hem de başlıca kemirgenlerden oluşan deney hayvanlarında birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu birbirinden farklı sonuçlar ortaya koysa da anoreksijenik peptitler tarafından düzenlenen besin alma ihtiyacı ve bu peptitlerin obezite ile ilişkileri güncel çalışmaların ilgi odağı durumundadır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda stres sonrası her iki yönde de besin alımı değişiklikleri kaydedilmişken, deney hayvanlarında özellikle akut stres sonrasında besin alımının önemli oranda baskılandığı gösterilmiştir. Nesfatin-1 ve nöronostatin yakın zamanda tanımlanan besin alımını baskılayıcı etkileri olan ve hipotalamusla beyin sapında yerleşik nöronlarca sentezlenen nöropeptitlerdir.

Çalışmada, besin alımını etkilediği bilinen nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stresten etkilenip etkilenmediği ve eğer etkileniyorsa bu etkileşimde glutamaterjik sistemin rolü incelenmiştir.

c-Fos veya pSTAT nöronal aktivasyonun gösterilmesinde belirteç protein olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle stres uygulamaları sonrası yapılan immünohistokimyasal işaretlemelerde c-Fos nesfatin-1 için, pSTAT5 nöronostatin için aktivasyon belirteci olarak kullanılmıştır.

Stres etkileri değerlendirildiğinde, akut stres modellerinin tamamında deney hayvanlarında nesfatin-1 nöronlarının aktifleştirdiği çalışmamızda ortaya konmuştur. Nesfatin-1 nöronlarında stres sonrasında nöronal aktivasyonun belirlenmesi, bu nöronların stres sinyallerini algılayarak besin alımını baskılama yönünde aktive olduklarını düşündürmektedir. Nöronostatin nöronlarında ise stres sonrası belirgin bir aktivasyon görülmemiştir.

Strese bağlı aktivasyon belirlenmesinin ardından, bu aktivasyona, stres öncesi uygulanan glutamat antagonistlerinin etkisi incelenmiştir. Bu etki aktivasyonu baskılama yönünde çıkmış, özellikle nesfatin-1 nöronlarının strese bağlı aktivasyonunda glutamaterjik sistemin ve glutamat reseptörlerinin rolü olduğu ve glutamati nörotransmitter olarak kullanan üst merkezlerin de bu regölasyona katılma olasılığını düşündürmüştür.

Stres sonrası besin alımının engellendiği gösterildikten sonra bu etkinin gerçekteşmesinde glutamaterjik sistemin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla glutamaterjik sistemin (N-metil D-aspartat) NMDA reseptörleri için MK-801 antagonisti, non-NMDA reseptörleri için ise CNQX antagonistleri kullanılmıştır. İntraperitoneal olarak antagonistlerin uygulanması ile deney hayvanlarında antagonist etki, stres uygulamaları ile de agonist etki oluşturulmuştur. Antagonist-agonist etki oluşturulması sonucu deney hayvanlarında stres ile oluşan agonist etki kontrol grubuna yakın bir düzeye gerilemiştir. Bu sonuçların tamamı değerlendirildiğinde, immobilizasyon, yüzme ve akut enflamatuvar stres sonrası nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunda glutamaterjik sistemin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar besin alımını inhibe eden nesfatin-1 nöronları bakımından yorumlandığında ise literatüre önemli katkılar sağlayacak bilgiler elde edilmiştir.

Sonuç olarak akut psikolojik, fizyolojik ve psikolojik-fizyolojik stres sonrası nesfatin-1 aktivasyonu ile gerçekteşen besin alımının azalmasına glutamaterjik sistemin aracılık ettiği çalışmamızda ortaya konmuştur. Cinsiyetler bakımından karşılaştırıldığında ise gruplar arasında önemli bir farklılık görülmemiş, genel olarak akut stressörlerden dişi ve erkeklerin birbirine yakın düzeylerde etkilendiği belirlenmiştir.

Bugüne kadar literatürde nesfatin-1 nöronlarının etki mekanizması ile glutamaterjik sistem ilişkisi ortaya konmadığı literatür araştırmalarında belirlenmiştir. Bu çalışmada stresin beslenmeyi düzenleyen merkezi mekanizmaları bozarak besin alımını azalttığı çeşitli stressörler ve çeşitli modeller kullanılarak geniş bir şekilde açıklığa kavuşturulmuştur. Ayrıca besin alımının akut stres sonrası azalmasında glutamaterjik sistemin rolü antagonistler

kullanılarak yapılan çalışmalar ile ortaya konmuş ve çalışma bu anlamda yüksek zgn değer taşımaktadır.

Çalışmada genel olarak değerlendirildiğinde, proje kapsamında elde edilen bulguların, konuyla ilgili literatüre yapacağı katkılar yanında ileride strese bağlı oluşan ya da oluşabilecek beslenme bozukluklarının moleküler mekanizmasının ortaya konmasında ve bu bozuklukların tedavisinde uygulanacak moleküler ve farmakolojik yaklaşımlar için klinik çalışmaların planlanmasında yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Tüm canlı organizmalar iç ve dış stres faktörlerinin etkisi altındadır ve bu etkilere karşı normal dengelerini yani homeostazı korumaya çalışırlar. Strese adaptasyon ve homeostazın korunmasında çeşitli nörolojik ve endokrin mekanizmalar rol oynarlar. Bu mekanizmaların aktive olmasında davranışsal, endokrin, immün ve otonom sinir sistemlerinin etkileri görülmektedir (Fink ve ark., 2012).

Stres düzeyleri akut ya da kronik dönemde patolojik boyuta gelmesiyle vücutta homeostazın bozulması birçok sistemin aynı zamanda geri dönüşsüz bir şekilde bozulmasına yol açabilir. Stresin etkilediği birçok alan bulunmakla beraber stresten ilk etkilenen davranış biçimi yeme davranışıdır.

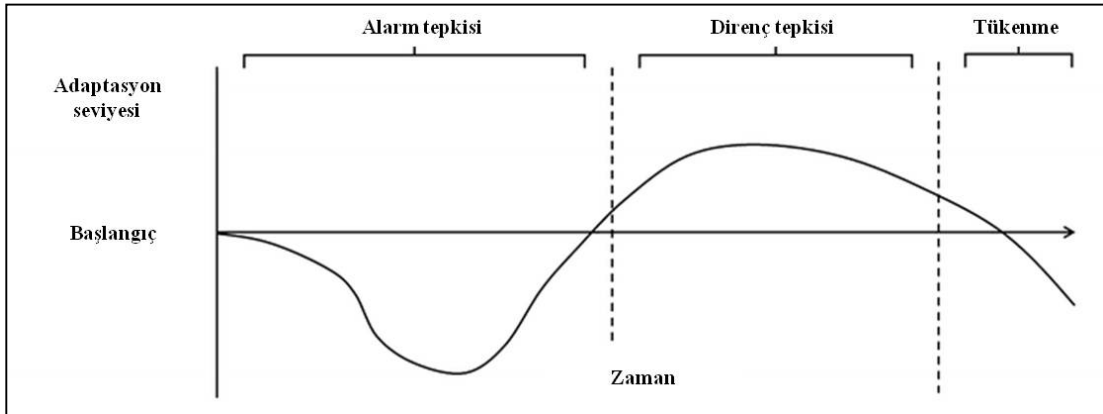
2.1. Stres

Stres canlı organizmaların çevresel ya da fizyolojik durumlarının değişimine verdiği doğal bir tepkidir. Ayrıca akut stressörlere uygun miktarda ve uygun zamanda stres yanıtının verilmesi ve sona erdirilmesi, organizmanın sağ kalımı için kritik öneme sahiptir (Charmandari ve ark., 2005).

Stres terimi biyolojide ilk olarak 1936 yılında Macaristan'lı bir histolog-endokrinolog Hans Selye tarafından vücudun dışarıdan gelen ve genelde zararlı olan uyaranlara karşı verdiği yanıt olarak tanımlanmıştır (Selye, 1936). Burchfield ise merkezi sinir sistemine daha fazla odaklı olarak stres durumunu psikolojik homeostatik süreçlerde bozulma olarak tanımlamıştır (Burchfield, 1979). Stres biyolojik olarak HPA aksının aktivasyonunu içeren çeşitli fizyolojik değişiklikler olarak tanımlanmıştır. Stres durumuna karşı oluşturulan ve HPA

aksının aktivasyonu yoluyla gelişen adaptif davranış değişiklikleri, bedensel taleplere veya homeostaza yönelik zorluklara verilen yanıtın bir diğer önemli bileşenidir (Koob, 1999).

Stres terimini ortaya çıkaran Hans Selye tarafından tanımlanan “stres teorisi” olarak da bilinen “genel adaptasyon sendromu (G.A.S.)” aslında vücudun stres ile karşılaştığında verdiği tepkileri tarif eden bir çizelgedir (Şekil 1). Bu çizelgeye göre; stres ile karşılaşıldığında ilk verilen tepki “alarm” tepkisidir. Bu evrede yine Selye tarafından tanımlanan “savaş ya da kaç” tepkisi oluşur. Kortizol, adrenalin ve noradrenalin salgılanır. Organizma ya stres etkeni ile savaşıyor ve ikinci aşamaya geçer ya da stres etkenini göz ardı ederek uzaklaşır. Bu evrede organizmanın dayanma gücü azalır ve stressör yeterince şiddetli ise ölüm ile sonuçlanabilir. İkinci aşama “direnc ya da adaptasyon” tepkisinin geliştiği aşamadır. Direnme durumunu seçen organizmanın stres hormon düzeyleri normale döner ve durumun stabil kalmasını sağlar ancak dayanma gücü bir miktar azalır. Ancak stres etkeni daha fazla devam ederse adaptasyon enerjisi tükenir ve organizma “tükenme” aşamasına geçer. Alarm dönemindeki belirtiler yeniden alevlenir. Bu aşama geri dönüşsüzdür ve ölümle sonuçlanır (Selye, 1950).



Şekil 1. Strese verilen tepkinin aşamalarını gösteren Hans Selye'nin genel adaptasyon sendromu çizelgesi (Cunanan ve ark., 2018).

Akut stres yanıtlarının organizma için gerekli olmasının yanı sıra kronik ve travmatik stres etkenleri, beyinde ve diğer organlarda zararlı değişikliklere neden

olan zıt etkiye sahiptir ve travma sonrası stres bozukluğu, depresyon, kronik anksiyete gibi nöropsikiyatrik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıkların da (Levine ve ark., 2014) dahil olduğu birçok patolojik sürecin gelişimi ile bağlantılıdır (Smith and Vale, 2012). HPA aksı aşırı aktivasyonu, anksiyete bozuklukları ve depresyon psikopatolojisine neden olabilir ve kronik şiddetli stres ile vücut organlarında fizyolojik hasara yol açabilir (Koob, 1999).

Stres ile başa çıkma mekanizmaları kadınlar ve erkekler arasında farklılıklar göstermektedir (Bale and Epperson, 2015). Erkek ve kadınlar arasındaki stres yanıtı farklılıklarının gonadal hormonlarla ilgili olduğu ve özellikle kadınlarda menstrüel döngülerine göre değişim gösterdiği kemirgenler ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Viau and Meaney, 1991). Ayrıca stres hormonlarının yüksek miktarda dolaşımında olmasının nöroendokrin olarak düzenlenen hormon sistemlerini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Catherine Rivier and Rivest, 1991).

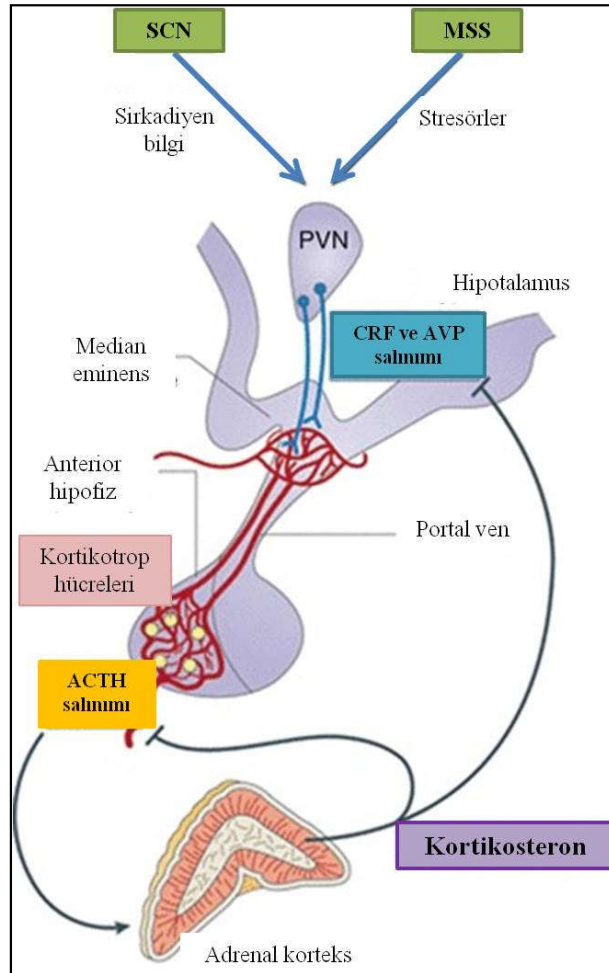
Geri besleme kontrol sistemleri yani feed-back mekanizmaları, vücudun normal fizyolojik işleyişi ve homeostazı için esastır. Negatif geri besleme daha yaygın görülmekle beraber negatif ve pozitif geri besleme mekanizması olmak üzere iki tür geri bildirim mekanizması vardır (Fink ve ark., 2012). Homeostaz yani vücudun iç ortamının bir denge içinde bulunması durumu için çok önemli olan negatif geri besleme kontrol mekanizmaları, yükselen bir molekül ekspresyonunu denetleyerek önceden belirlenmiş bazal seviyeye geri getiren bir sistemi içermektedir. Negatif geri besleme kontrolü, molekülleri, hücreleri ve sistemleri etkileyerek vücutta geniş çapta çalışmaktadır. Bazal noktanın fonksiyonel ve anatomik olarak belirlendiği mekanizmalar sistemler ve türler arasında değişir (Fink ve ark., 2012).

HPA aksı, sempatik ve medullar sistemler ile birlikte, nöroendokrin strese verilen cevapta önemli bir rol oynar. HPA aksı homeostazı, adrenal glukokortikoidlerin, kortizol veya kortikosteronun, ACTH sentezi ve salıverilmesini içeren net bir negatif geri besleme sistemi ile sağlanır. Allostopsisin yani artan stres yüküyle başa çıkmak için HPA aksı aktivitesindeki değişimin, geri besleme bazal noktasındaki değişiklik ile ortaya çıkacağı

düşünülmektedir (Fink ve ark., 2012). Stres durumu ve stres yanıtları organizmada HPA aksı ile düzenlenmektedir.

2.2. Hipotalamik Hipofizer Adrenal Aks

Hipotalamik–hipofizer–adrenal (HPA) aksı (Şekil 2) stresli yaşam koşullarına uygun ve zamanında tepki oluşturan ve vücutta üç ana yapıyı kullanan nöroendokrin bir döngüdür. Bu yapılar hipotalamusun paraventriküler nukleusu (PVN), anterior hipofiz bezi ve adrenal bezdir (Oyola ve Handa, 2017). PVN'deki özel hücre grupları kortikotropin-salıverici hormonun hipofiziyal portal dolaşıma sentez ve salınmasını sağlayan nöronal ve humoral uyarıları aktifleştirir (Oyola ve Handa, 2017).



Şekil 2. Hipotalamik-Hipofizier Adrenal Aks (Sassone-Corsi ve Christen, 2016).

Normal durumda, negatif geri besleme döngüsü bozulmadan, beyin koruma durumunda bazal nokta, ACTH sekresyonunu nispeten dar bir bant genişliği içinde tutar. Bu bant genişliği içinde ACTH'nin bazal salgılanması pulsatildir ve hem metabolik bozunma hem de vücudun birkaç alanına dağılmasını takiben kandan hızla temizlenir. Plazma ACTH konsantrasyonları, sabahları zirvede bulunmaktadır ve gece yarısı civarında nadir görülen bir düşüş ile sirkadiyen bir ritim gösterir. Kemirgenler gibi nokturnal hayvanlarda, ritmin bu fazı tersine çevrilir, böylece plazma ACTH konsantrasyonları karanlığın başlamasından hemen önce bir en yüksek seviyesine ulaşır. Hem gündüz hem de gece canlılarında temel bir özellik, kortikosteroid plazma konsantrasyonlarının, hayvanın uykudan uyanmasından hemen önce en yüksek seviyeye ulaşmasıdır. Kortizol seviyeleri uykudan hemen önce veya uyku sırasında en düşük seviyededir (Fink ve ark., 2012; Orth ve Mount, 1987).

Pulsatil, ultradian ACTH salgılanması, pulsatil glukokortikoid salgılanmasının yönlendirilmesinden sorumludur ve yönlendirme steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ve P450scc heteronükleer RNA seviyelerindeki paralel değişikliklerle ilişkilidir (Spiga ve ark., 2011). Sadece bağlanmamış serbest glukokortikoidler ACTH salımını inhibe eder. Bu nedenle, glukokortikoid bağlanma ve metabolizma derecesi, ayrıca adrenal salgılanmanın büyüklüğü de negatif geri besleme sinyalinin gücünü belirler (Orth ve Mount, 1987). CRF, anterior hipofizi uyarak buradan adrenokortikotropik hormonun (ACTH) kan dolaşımına salınmasını uyaran 41 aminoasitlik bir peptittir. ACTH'nin dolaşıma salınmasını takiben adrenal kortekste glukokortikoidlerin sentezlenmesi uyarılmış olur (Rivier ve Vale, 1985; Ulrich-Lai ve Herman, 2009).

Bütün steroid hormonlar gibi glukokortikoidler de kendi adrenal bez kortikal hücrelerinden salıverilirler. İnsanlardaki primer glukokortikoid kortizol iken fare ve sıçanlarda primer glukokortikoid kortikosterondur. Bu steroid hormonlar çevresel ya da psikolojik stres faktörlerine uygun tepkileri vermek için farklı afinitelere sahip mineralokortikoid (MR) ve glukokortikoid reseptörlerine (GR) bağlanarak etki gösterirler (De Kloet ve ark., 2005; Reul ve Kloet, 1985). HPA aksı farklı beyin bölgelerinde etki gösteren aynı hormonlar tarafından inhibe

edilir. Bu negatif geri besleme sürecinin oluşturduğu yanıtlar sayesinde temel homeostatik durumun korunması ve aynı zamanda adaptasyonu sağlanır (McEwen ve Gianaros, 2010).

2.2.1. Paraventriküler Nukleus

Paraventriküler nukleus (PVN), HPA aksı aktivasyonunu düzenleyen çok sayıda anahtar nörona ev sahipliği yapan bir çekirdektir. Buradaki nöronlar metabolizma, büyüme ve gastrointestinal, kardiyovasküler ve renal fonksiyonların pre-otonomik kontrolü gibi immün fonksiyonların da dahil olduğu çok sayıda metabolik olayın gerçekleşmesinde rol alırlar (Ferguson ve ark., 2008).

PVN'daki nöronlar büyüklüklerine göre iki gruba ayrılır (Gurdjian, 1927). Medial parvoselüler bölümdeki nöronlar küçük nukleuslara sahip iken lateral magnoselüler alandaki nöronlar büyük nukleuslara sahiptir. Sıçanlarda PVN'daki nöronların sitolojik ve kimyasal yapıları araştırıldığında fare ve insanlardaki PVN'un diğer türlere göre önemli farklılıkları bulunmaktadır (Biag ve ark., 2012).

PVN'daki nöronlar hücresel fibril özelliklerine göre iki ana grupta incelenirler: **nöroendokrin** ve **pre-otonomik**. Nöroendokrin hücreler median eminens ya da posterior hipofiz bezine projeksiyon yaparlar. Median eminens'de kendi kimyasal içeriklerini hipotalamo-hipofiziyal portal venlere bırakırlar, bu venler iki venöz kapiller yumak oluşturarak ilerler ve böylece hipotalamus ve hipofiz bezi arasında hızlı bir şekilde hormonların taşınması gerçekleşir (Ferguson ve ark., 2008; Swanson ve Sawchenko, 1983). Salıverilen bu faktörler anterior hipofize ulaştıklarında buradan hormonların genel dolaşıma salıverilmesini tetikler. CRF, tirotropin salıverici hormon (TRH), oksitosin (OT), dopamin, somatostatin (SST), and vazopressin (AVP) eksprese eden nöronlar buradan median eminens'e projeksiyon yaparlar (Ferguson ve ark., 2008). Ek olarak oksitosin ve vazopressin magnoselüler nöronları posterior hipofize projeksiyon yaparak salgılarını direkt olarak genel dolaşıma geçirirler (Sawchenko ve ark., 2007).

PVN'daki pre-otonomik nöronlar, kardiyovasküler termoregülasyon ve gastrointestinal fonksiyonlar için beyin sapı ve spinal korddaki pre-gangliyonik otonomik nöronlar ile direkt olarak projeksiyon yaparlar (Geerling ve ark., 2010). Sıçan nöroendokrin nöronları nöron boyut ve projeksiyonlarına göre **magnoselüler** ve **parvoselüler** olmak üzere ayrılırlar (Swanson ve Sawchenko, 1980). Magnoselüler bölümdeki oksitosin ve vazopressin nöronları posterior hipofiz bezine projeksiyon yaparlar ve gerekli hormonları buraya salgırlar. Nörosekretuar parvoselüler bölümdeki CRF, vazopressin ve TRH nöronları ise direkt hipotalamo-hipofiziyal portal dolaşımın bir parçasıdır (Cunningham ve Sawchenko, 1991; Swanson ve Sawchenko, 1980; Wotjak ve ark., 1996). HPA aksı regülasyonu için önem taşıyan bu nöropeptitler, hipotalamo-hipofiziyal portal venler tarafından, ACTH'yi kan akımına bırakan kortikotropların lokalize olduğu anterior hipofize taşınırlar (Smith ve Vale, 2012). İlginç olarak kemirgenler ve insanlarda dişi ve erkeklerden PVN morfolojisi bazı istisnalar dışında oldukça benzerdir. Örneğin, dişilerde PVN'daki vazopressin nöronları erkeklerdekinden daha büyüktür (Ishunina, 1999). Strese maruziyetinin ardından, PVN nöronlarında CRF salınımı, dişilerde erkek sıçanlardan daha büyük ACTH tepkisi tetiklenir (Mevel ve ark., 1979). Ayrıca dişi sıçanlarda stres sonrası daha güçlü bir vazopressin salınımı görülür ki bu da HPA aksının PVN seviyesinde çevresel etkenlere verdiği yanıtta cinsel dimorfizm olduğunu göstermektedir (Williams ve ark., 1985).

Hipotalamusun paraventriküler çekirdekleri, hipofizin ACTH sentezi ve salınımının nöral kontrolüne aracılık eden nöronları içermektedir. Birçok çalışmada, HPA aksının ayar noktasının ana bileşeni olarak PVN'a işaret etmektedir. Çalışmalarda, sıçandaki glukokortikoid negatif geri beslemesinin PVN lezyonları tarafından bozulduğu göstermiştir (Dockray ve Steptoe, 2011). PVN, uyarıcı ve inhibe edici sinirsel girdilerin yanında beyindeki anahtar sirkadiyen osilatör olan suprakiazmatik nukleustan (SCN) daha fazla projeksiyon alan bir bölgedir. PVN'daki bu aktivasyona hipofiziyal portal damar dolaşımına salınan ve hipofizi tetikleyen "stres nörohormonları" olan CRF-41, arginin ve vazopressin aracılık eder. Sistemik dolaşıma salınan ACTH, adrenal kortikosteroid sentezini ve salınımını uyarır (Fink ve ark., 1988; Vale ve ark., 1981).

2.2.2. Kortikotropin Salıverici Faktör

Kortikotropin salıverici faktör (CRF, CRH) stresin endokrin, otonomik ve immün yanıtlarının aracısıdır (De Souza, 1995; Owens ve Nemeroff, 1991; Vale ve ark., 1981). Memelilerde HPA aksının temel düzenleyicisi olan kortikotropin salıverici hormon ya da faktördür (Herman ve Cullinan, 1997) ve hem bir nörotransmitter hem de önemli bir nörohormondur (Koob, 1999).

CRF, CRFR-1 ve CRFR-2 olmak üzere iki reseptöre sahiptir (Lovenberg ve ark., 1995; Perrin ve ark., 1993). CRF reseptörlerinin ikisi de G-protein bağımlı reseptörlerdir (De Souza, 1987; Perrin ve ark., 1993). CRF-1 reseptörü başlıca medial septum, hipofiz, korteks, serebellum, arka beyin ve olfaktor bulbustan eksprese edilir (Primus, 1997). CRF-2 reseptörü ise lateral septum, ventral medial hipotalamus ve koroid pleksusta eksprese edilmektedir (Chalmers ve ark., 1995; Perrin ve ark., 1995; Primus, 1997). CRF ve yine bir stres nörohormonu olan ürokortinin CRF-1 reseptörüne bağlanmaya yüksek afinitesi vardır fakat ürokortin yalnızca CRF-2 reseptörüne bağlanır bu durum da ürokortinin CRF-2 reseptörü için endojen bir ligand olduğu hipotezi ile açıklanmaktadır (Vaughan ve ark., 1995).

CRF, bir stres yanıtı olarak (Arborelius ve ark., 1999; Mattson, 2000) hipotalamik PVN'un parvoselüler nöronlarından sentezlenir ve otonomik etki gösterdiği bilinen median eminensin eksternal bölgesine salınır (Lehnert ve ark., 1998). CRF, portal damarlar yoluyla ön hipofize ulaştığında, ön hipofizdeki kortikotropin uyararak bir pre-pro-hormon olan propriomelanokortin (POMC) sentezlenmesini uyarır ve bu da ACTH'un genel dolaşıma serbest bırakılmasını sağlar (Blas, 2015; Bonfiglio ve ark., 2011).

Klasik olarak PVN, HPA aksını düzenleyen CRF nöronlarını içeren birincil yapı olarak kabul edilir ve memelilerde, PVN içindeki bu nöronlar, maternal yoksunluk (Chen ve ark., 2012), immobilizasyon stresi (Girotti ve ark., 2006), hiperozmotik stres (Aman ve ark., 2016; Jaccoby ve ark., 1997; Sharp ve ark., 1995), ısı stresi (Cramer ve ark., 2015), sosyal stres (Xie ve ark., 2010) ayrıca ozmotik ve metabolik stresin de (Yadawa and Chaturvedi, 2016) dahil

olduğu çeşitli stresörlere yanıtta rol alır. PVN'da da CRF CRFR-1 ve CRFR-2 olmak üzere iki tip reseptör aracılığıyla etki gösterir (Potter ve ark., 1994).

Akut ve kronik bir psikojenik stres etkeni olan immobilizasyon, ön hipofizde CRFR-1 ve CRFR-2'de önemli değişikliklere ve plazma kortizol düzeyinde anlamlı artışlara neden olmuştur (Kang ve Kuenzel, 2014; Kuenzel ve ark., 2013). Stres tepkisindeki pozitif geri besleme mekanizması, ilk olarak, kemirgenlerde keşfedilmiştir. Bu da memelilerde, PVN'daki CRF nöronlarının, ana reseptörünün ekspresyonundaki sürekli artmaya bağlı olarak stres tepkisinin sürdürülmesinde rol oynadığını düşündürmektedir (Toshihiro Imaki ve ark., 1996, 2001). Merkezi sinir sisteminde CRF'ün nörotrofik rolü oldukça önemlidir. CRF immünoreaktivitesi merkezi sinir sisteminde hem hipotalamik hem de ekstrapitalamik yapılarda görülmektedir (Bloom ve ark., 1982; Swanson ve ark., 1983). Çeşitli beyin bölgelerine ya da merkezi sinir sistemine icv. CRF uygulaması stres durumunda oluşan çok çeşitli davranışsal etkileri üretmektedir (Aldenhoff ve ark., 1983; Dunn ve Berridge, 1987). Davranış testlerinde CRF'ün akustik irkilme tepkisi gibi anksiyogenik-benzeri etkiye sahip olduğu (Swerdlow ve ark., 1986), koşullanmış korkuyu (Cole, 1988) ve stres kaynaklı donma davranışını arttırdığı (Sherman and Kalin, 1988) gösterilmiştir.

CRF, stres durumuna benzeyen başka davranışsal tepkileri de uyarmaktadır ve bu tepkiler HPA aksından bağımsız olarak gerçekleşmektedir (Morley ve Levine, 1982). Birçok çalışmada akut veya kronik stres sonrası hipotalamustaki CRF biyoaktivitesindeki immünoreaktif değişiklikler tanımlanmıştır (Chappell ve ark., 1986; Haas ve George, 1988; Hiroshige ve ark., 1977). Immobilizasyon, zorla yüzdürme stresi, hipertonic salin enjeksiyonu stresi (Lightman ve Harbuz, 2007), streptokokal hücre duvarı tarafından uyarılmış artrit (Sternberg ve ark., 1989), insülin ile uyarılmış hipoglisemi (Suda ve ark., 1988) ve elektrokonvülsif şok (Herman ve ark., 1989) gibi çok çeşitli stres türleri ile yapılan çalışmalarda hipotalamik CRF mRNA'sının artış gösterdiği bildirilmiştir. CRF'ün icv. uygulanmasının farelerde besin alımını azalttığı bildirilmiştir (Arase ve ark., 1988; De Pedro ve ark., 1993; Krahn ve ark., 1986; Rosenthal ve Morley, 1989). CRF'ün tat alma bozukluğu gibi stres benzeri etkileri önleyici özelliği

bulunmaktadır (Cador ve ark., 1992; Heinrichs ve ark., 1991). Bu nedenle, eksojen olarak uygulanan CRF davranışsal bir aktivasyon oluşturur ve strese karşı davranışsal tepkileri arttırmaktadır (Aldenhoff ve ark., 1983; Dunn ve Berridge, 1990).

Yapılan çalışmalar CRF antagonistlerinin açık alan stresi, immobilizasyon, zorla yüzdürme stresi, ethanole maruz bırakma stresi ve sosyal stres gibi stres etkilerini azalttığını göstermiştir (Heinrichs ve Koob, 1992; Menzaghi ve ark., 1994). Benzer etkiler stres tarafından etkilenen besin alımı çalışmalarında da görülmüştür. Alpha-helical CRF9–41, immobilizasyon stresine maruziyet sonrası stres tarafından azalan besin alımını tersine çevirmiştir (Krahn ve ark., 1986), beslenme yetersizliği görülen durumlarda tanıtık gıda alımında azalma (Heinrichs ve Koob, 1992), ve nöropeptit-Y (NPY) uygulaması besin alımını arttırmıştır. CRF-1 reseptörü knock-out farelerde stressörlere hipofiziyal adrenal yanıt ve strese karşı davranışsal yanıt görülmemektedir (Timpl ve ark., 1998). Bu genetik manipölasyonlar, ekstrapotalamik CRF'nin strese karşı davranışsal tepkilerde ve insan psikopatolojisinde önemli bir rol oynadığı hipotezini desteklemektedir. CRF'nin icv. enjeksiyonu ve stresi takiben spesifik beyin alanlarındaki erken gen ürünü olan c-Fos ekspresyonundaki artışın fonksiyonel önemi ve fizyolojik sonuçları hala belirsizdir (Imaki ve ark., 1995).

Hipotalamik paraventricüler nükleusta parvoselüler CRF eksprese eden nöronlar, akut stresin ardından güçlü bir c-Fos yanıtı gösterir (Stamp ve Herbert, 1999; Ströhle, 2003; Viau ve Sawchenko, 2002). Stres kaynaklı kan kortizol seviyesinin artması için CRF nöronlarının artmış aktivitesi gereklidir (Jacobson ve ark., 2000). Bazal kortizol düzeyinin sirkadiyen değişiminde CRF nöronlarının etkisi tam olarak kesinleşmemiştir (Dickmeis ve ark., 2013). CRF nöronları glukokortikoid negatif geri beslemesinin düzenlendiği başlıca hücrelerdir (Dallman ve ark., 1987; Fink ve ark., 1991; Keller-Wood ve Dallman, 1984; Watts, 2005). PVN'daki CRF nöronları, beyin kontrollü efektör yanıt sistemlerinden biri olarak son ortak nöron işlevi görür (Herman ve ark., 2003; Myers ve ark., 2017; Ulrich-Lai ve Herman, 2009).

2.2.3. Kortikotropin Saliverici Faktör Reseptörleri (CRFR-1 ve CRFR-2)

İnsan hipofiz CRF reseptörünü kodlayan cDNA yapısı ilk olarak 1993 yılında tanımlanmıştır (Chen ve ark., 2006). CRF reseptörü ayrıca sıçan beyinde de gösterilmiştir (Chang ve ark., 1993; Perrin ve ark., 1993; Lovenberg ve ark., 1995). CRF reseptörünün varlığı lateral septumda, hipotalamusun ventromedial çekirdeğinde (VMN) ve birkaç amigdaloid çekirdekte gösterilmiştir (Lovenberg ve ark., 1995). Bu alanlarda görülen yüksek CRF reseptör ekspresyonuna rağmen neokorteks ve cerebral kortekste CRF reseptör ekspresyonu saptanmamıştır (Lovenberg ve ark., 1995).

Memelilerde iki tip CRF reseptörü vardır. Fakat CRFR-1 kortikotroplardan ACTH salınması için gerekli olan primer reseptördür. Hem CRFR-1 hem de CRFR-2 7-transmembran G-protein çiftli reseptörü içerir ve bu reseptörler adenilat siklazın uyarılması için cAMP aktivitesini arttırmak yoluyla etki ederler. ACTH salınımı sonuç olarak cAMP protein kinaz A yolağı tarafından kontrol edilen intrasellüler kalsiyum salınımının artışına sebep olur (Majzoub, 2006). CRF-bağlayıcı protein (CRFBP) CRF bağlayan ve CRF reseptör ile benzer ya da daha yüksek afiniteye sahip bir proteindir. Anterior hipofiz kortikotroplarından salınır ve genellikle serbest CRF'a bağlanır, böylece anterior hipofizdeki kortikotroplardaki CRF etkisi durdurulmuş olur (Cortright ve ark., 1995; Seasholtz ve ark., 2001).

CRF₁ ve CRF_{2α} reseptörlerinin yanıtları çeşitli stressörler karşısında farklılıklar göstermektedir. Birçok stressör CRF₁ mRNA'sını hipotalamusun paraventriküler nukleusunda upregüle etmektedir (Lacroix ve Rivest, 1996; Lee ve Rivier, 1997; Mansi ve ark., 1996). Bu upregülasyon CRF reseptör alt tipi olan CRF₁'in HPA aksına aracılık eden CRF reseptör tipi olduğunu düşündürmektedir. CRF_{2α} reseptörünün rolü ise daha çok anne yoksunluğu ve beslenme davranışları ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda sıçanlarda gıda yoksunluğu ve maternal yoksunluğa cevap olarak CRF_{2α} mRNA'sının azaldığı gösterilmiştir (Eghbal-Ahmadi ve ark., 1997; Makino ve ark., 2017; Timofeeva ve Richard, 1997).

2.2.4. Hipofiz Bezi

Hipofiz bezi yani pitüiter bez erkeklerde yaklaşık 0,5 gr, kadınlarda ise yaklaşık 1,5 gr ağırlığında; beyin tabanında sella tursikada yerleşik birleşik endokrin bir bezdir. Hipotalamusa infundibulum ile bağlanır. Hipofiz; anterior hipofiz (adenohipofiz) adında Rathke kesesi kökenli büyük parçadan ve posterior hipofiz (nörohipofiz) adında nöroektoderm kökenli bir nöral doku parçası olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).

Adenohipofiz bölümü tipik bir endokrin bez şeklinde düzenlenir ve anterior lobun en büyük bölümü olan **pars distalis**, pars distalise komşu posterior bölümün ince bir kalıntısı olan **pars intermediya** ve hipofizin kalınlaşmış duvarından oluşan **pars tuberalis** bölümlerinden meydana gelmektedir. Adenohipofiz tipik olarak hipotalamik sinyallere yanıt veren hücresel kordonlar ve geniş çaplı sinüzoidal kapillerlerden oluşmaktadır. Adenohipofizden başlıca adrenokortikotropik hormon (ACTH), tirotropik hormon (TSH), folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH) sentezleyen vücuttaki endokrin bezlerin aktivitesini düzenleyen hücreler bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).

Pars distalis bölümünde; sekretuar hücrelerin boyanma özelliklerine göre asidofil (%40) ve bazofil (%10) boyanan kromofil hücreler ve kromofob hücreler (%50) olmak üzere üç tip hücre bulunmaktadır. Pars distalisteki hücreler salgılarına göre büyüme hormonunu üreten somatotroplar (GH hücreleri), prolaktin üretiminin sorumlu olan laktotroplar (PRL hücreleri, mammotroplar), ACTH üreten kortikotroplar (ACTH hücreleri), FSH ve LH üreten gonadotroplar (FSH ve LH hücreleri) ve TSH üreten tirotroplar (TSH hücreleri) olmak üzere beş tiptir (Ross ve Pawlina, 2011).

Pars intermediya bölümünde; bazofil kromofil hücreler ve kromofoblar bulunmaktadır. Aynı zamanda Rathke kesesinin embriyonik kalıntısı olan Rathke kistleri içi sıvı dolu küçük kistik kaviteler şeklinde bu alanda bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).

Pars tuberalis bölümünde; hipotalamik-hipofizier portal sistemin venleri ve parankimal hücreler bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011).

Nörohipofiz ise; **pars nervosa** ve **infundibulum** bölümlerinden oluşmaktadır. Pars nervozada, hücre gövdeleri hipotalamik nukleuslarda bulunan nöroendokrin nöronların miyelinsiz aksonları ve sinir sonlanmaları bulunmaktadır. Pars nervozanın sinir sonlanmalarında çapları 10-30 nm. olan ve birleştiklerinde Hering cisimciklerini oluşturan küçük veziküller, asetilkolin içeren 30 nm.'lik veziküller ve oksitosin, vazopressin, antidiüretik hormon (ADH) ve nörofizin içeren 50-80 nm.'lik daha büyük veziküller içermektedir (Ross ve Pawlina, 2011).

Hipofiz bezi protein yapıdaki hormonların salgılanması yoluyla, stres sırasında ve sonrasında, büyüme ve metabolizma gibi fizyolojik süreçlerde vücut homeostazının korunmasında kritik bir rol oynar (Perez-Castro ve ark., 2012). Posterior hipofize supraoptik nukleusta (SON) ve PVN'da bulunan magnoselüler oksitosin ve vazopressin nöronlarının aksonları aksonlarını uzatmaktadır (Perez-Castro ve ark., 2012) ve buradan genel dolaşıma sekresyonlarını bırakırlar. Zıt olarak, kortikotroplar HPA aksının düzenlenmesi ve ACTH üretimi için anterior hipofiz için anahtar hücre tipidir. Bu hücreler CRF'un bağlanabileceği ve hipotalamustan gelen sinyaller doğrultusunda ACTH'u uyaran reseptörleri içermektedir. CRFR-1'in aktivasyonu kortikotroplardan ACTH salınımını uyarır (Bale ve Vale, 2004).

2.2.5. Adrenokortikotropik Hormon (ACTH)

Adrenokortikotropik hormon (ACTH) ön hipofizdeki endokrin hücreler olan kortikotroplar tarafından sentezlenip salgılanan 39 aminoasitlik bir peptittir. Bu hormonun sıçanlar ve farelerdeki amino asit dizileri aynıdır ve insan dizisine kıyasla iki küçük amino asit sekansı daha vardır. ACTH peptiti, proopiomelanokortin (POMC) pro-hormonunun hücre tipi spesifik bir bölünme ürünüdür (Cawley ve ark., 2016).

Normal şartlarda kortikotroplar çok düşük iç aktiviteye sahiptir. Olgun peptit salgı veziküllerinde depolanır ve bu nedenle hızlı salınım için kullanılabilir (Dallman ve ark., 1987). ACTH'nin kortikotroplardan ekzositozu, öncelikle CRF-1 reseptörlerinde etkili olan CRF tarafından kontrol edilir. Vazopresin de V1bR

reseptörleri aracılığıyla önemli bir ko-faktör olarak etki gösterir (Aguilera ve Rabadan-Diehl, 2000). İnflamasyon ve enfeksiyon sırasında ortaya çıkan sitokinler gibi diğer faktörler kortikotrop aktivitesini doğrudan düzenleyebilir (Bernton ve ark., 1987).

2.2.6. Adrenal Bez

Adrenal bezler böbreklerin hemen üzerinde bulunan sarımsı bir dış alan yani adrenal korteks (%80-90) ve kırmızı renkte bir iç alan yani adrenal medulladan (%10-20) oluşmaktadır. Adrenal korteks mezoderm kökenlidir ve adrenal steroid hormonları sentezleyen ve salgılayan bölümdür. Adrenal medulla ise nöro-ektoderm kökenli olup katekolaminleri sentezleyip salgılamaktadır (Lazar, 2003). Adrenal bezler, vasküler sistem ile stratejik bağlantılara sahip olan bazal ve reaktif hormon seviyelerini düzenlemektedir (Rosol ve ark., 2001).

Adrenal korteks dışarıdan içeriye doğru **zona glomeruloza**, **zona fasikülata** ve **zona retikülaris** olmak üzere konsantrik diziliimli üç zondan oluşmaktadır (Mitani, 2014).

Zona glomeruloza tabakası adrenal bez kapsülünün hemen altında korteksin yaklaşık %10-15'ini oluşturan ve hücrelerinin glomerül şeklinde dizilmesi ile karakterize adrenal korteksin en dış tabakasıdır. Hücrelerin sitoplazmasında lipit damlacıkları bulunur. Zona glomeruloza tabakası hücreleri başlıca mineralokortikoid olan aldosteronu üretirler (Lazar, 2003).

Zona fasikülata tabakasındaki hücreler kübik şekilde ve kortikal sinüzoidler tarafından ayrılıp kolonlar şeklinde dizilim gösterirler. Steroid üreten hücre özelliklerine sahiptirler. Hücrelerinde bol miktarda lipit damlacıkları şeklinde depolanmış kolesterol olduğundan hücreler rutin hematoksilen- eozin boyama sonrasında köpük şeklinde görülür ve spongiosit olarak adlandırılır. Zona fasikülata tabakasında sentezlenen kortizol hücrelerde depolanmış halde bulunmaz. Kortizol sentezi için dolaşımda ACTH tarafından uyarılmış bir etki gereklidir. Kortizolün kortizona dönüşümü ise hepatositlerde gerçekleşir (Lazar, 2003).

Zona retikularis tabakası ise adrenal korteksin androjen üretimi ile ilişkili %5'lik bölümünü oluşturur. Sinüzoidler bu tabakadaki hücreleri anastomozlaşan bir ağ şeklinde düzenlenmesini sağlar. Bu tabakadaki hücreler lizozomlar, lipofuksin granülleri ve az bulunan lipit damlacıkları nedeniyle daha asidofilik boyanırlar. Dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion bu tabakada üretilen temel androjenlerdir. Zona retikularis ve zona fasikülata tabakasıyla arasında tam bir ayrım yapılamamaktadır ve her iki tabaka da ACTH tarafından uyarılır (Lazar, 2003).

Adrenal medulla ise otonomik sinir sistemi aktivasyonunu takiben epinefrin ve norepinefrin salınımı yoluyla homeostazın düzenlenmesinden sorumludur (Mitani, 2014). Adrenal medulla hücreleri kromaffin hücrelerdir. Kromaffin hücreler nöral krest kökenli ve sinüzoidler ile epitel kordonları ile çevrili modifiye sempatik post-gangliyonik nöronlardır (Lazar, 2003). Adrenal medulladaki kromaffin hücreler iki tiptir. Hücrelerin %80'i epinefrin üretirken, %20'lik bir bölümü ise norepinefrin sentezlemektedir (Lazar, 2003).

Glukokortikoidlerin sekresyonundan sorumlu olan başlıca bölüm zona fasikülata tabakasıdır. Zona fasikülata'daki hücreler melanokortin reseptör-2 (MC2R) eksprese etmektedir. Genel dolaşımdaki ACTH başlıca adrenal bezdeki MC2R'ü aktive etmektedir ve zona fasikülata bölümünde kortizol sentezini tetiklemektedir (Rivier ve Vale, 1985; Vale ve ark., 1981). Adrenal korteks tarafından salgılanan glukokortikoidler hem beyinde hem de hipofiz bezinde inhibe edici etki göstermektedir (Dockray ve Steptoe, 2011; Fink ve ark., 2012).

Adrenal bezden kortizol salınımı özellikle stres sonrası cinsiyetler arası farklılık göstermektedir. Stres sonrası kortizol seviyeleri dişi sıçanlarda hem daha uzun süreli hem de daha yüksek seviyelerde olmaktadır (Figueiredo ve ark., 2002).

2.2.7. Glukokortikoidler

Glukokortikoid hormonları, merkezi sinir sistemi de dahil olmak üzere tüm memeli fizyolojik sistemlerinin güçlü düzenleyicileridir (Joëls ve Baram, 2009; Munck ve ark., 1984; Sapolsky ve ark., 2000). Bu düzenleyici etkiler, ultradian,

sirkadiyen ve stres reaktif glukokortikoid hormon dolaşım seviyelerinin dinamik ve karmaşık bir profiline bağlıdır (Dallman ve ark., 1987; Munck ve ark., 1984). Deėiřmiř glukokortikoid hormon profilleri ayrıca kalıcı psikolojik veya fizyolojik stresin olumsuz sağlık etkilerine katkıda bulunur (Brochier ve Olié, 1993; McEwen, 2008; Reagan ve ark., 2008). Bu değiştirilmiş profiller, bazal glukokortikoid hormon salgısı dzenlerindeki değişiklikler ve/veya akut stres etkeni tehdidine cevap olarak yapılan değişiklikler ile ortaya çıkabilir (Abelson ve ark., 2007; Holsboer, 2000).

Glukokortikoid hormonları, HPA ekseninin sistemik efektör hormonudur. İnsanlarda, memelilerin çoğunda (örneğin köpekler ve hamsterler) ve çoğu balıkta başlıca dolaşımdaki başlıca glukokortikoid hormonu bir steroid molekül olan kortizoldür. Sıçanlarda, farelerde, kuşlarda ve çoğu sürüngende ise kortizolün eşdeğeri kortikosterondur. (Norris ve Carr, 2013).

Stresli olarak kabul edilen deneyimler ve etkiler genellikle kortizol salgılanması için etkili bir uyarıcıdır ve bu nedenle kortizole genel olarak bir stres hormonu denir. Bununla birlikte, stresli olarak kabul görmeyen egzersiz, anksiyolitik ilaçlar, cinsel deneyim gibi diğer uyarılar da kortizol sekresyonunu uyarabilir (Day ve Walker, 2007; de Graaf-Roelfsema ve ark., 2007; Kalman ve ark., 1997; Koolhaas ve ark., 2011; Romero, 2004). Zıt olarak stresli olduğu dőřünölen kronik nöropatik ağrı, anksiyete ya da kişinin kendi belirttiği stres gibi diğer durumlar da kesin olarak akut kortizol sekresyonu ile ilişkili değildir (Allen ve ark., 1985; Bomholt ve ark., 2005; Gagliano ve ark., 2008; Hellhammer ve ark., 2009).

Kortizol sekresyonu diurnal ritmin esas dzenleyicisidir ve fizyolojik fonksiyonların sirkadiyen dzenlenmesinin anahtar aracısıdır (Dickmeis ve ark., 2013). HPA aksı ile ilişkili olarak kortizol salınımı zamansal olarak üç bölüme ayrılabilir: Bazal ultradiyen atım, bazal sirkadiyen dalgalanma ve uyarı-arttırıcı aktivite (örn; stressörler). Kortizol salınımının bu farklı bileşenlerinin her biri, tek tek veya kombinasyon halinde, optimum moleküler, hücresel ve sistem seviyesinde fonksiyon göstererek etkili olurlar. Ek olarak, bu bileşenlerin her biri, HPA ekseninin anatomik elemanlarının her birine uygulanan ayrı dzenleyici

kontrol faktörlerine dayanır (Spencer ve Deak, 2017). Laboratuvar kemirgeninin bazal HPA eksen aktivitesi, kemirgen iç kafesinde gün boyunca rahatsız edilmeden bırakıldığında gözlemlenen aktiviteye karşılık gelir. Bu aktivite değişen çevresel uyaranların yokluğunda HPA aksının gerçek intrinsek aktivitesini yansıttığı düşünülebilir. Bu bazal aktivite hem ultradian hem sirkadiyen ritimlerin (ve bazı türlerde ayrıca bir sirkannal bileşen) bir bileşkesidir (Dickmeis ve ark., 2013).

Kontrollü ışık altındaki laboratuvar ortamında karanlık fazın başlangıcı, çoğu sıçan ve fare türü için kortikosteron düzeyinin pik yaptığı tepe seviyesine denk gelir. Kortikosterondaki günlük zirve noktası, ışıkların sönmelerinden birkaç saat önce başlayan sabit bir artış gösterir ve hayvanlar sürekli karanlıkta veya düşük ışık altında tutulsa bile günlük zirve devam eder (Kalsbeek ve ark., 2012). Akut bir stres etkeni veya diğer uyaranlar tarafından uyarılan endojen bir kortizol tepkisinin büyüklüğü, stres etkeni, türü, türlerin cinsiyeti ve yaşına göre değişebilir. HPA eksen stimülasyonuna verilen kortizol yanıtının dinamik aralığı, adrenal korteks içinde elde edilebilecek nispeten sınırlı bir maksimum kortizol üretim hızı seviyesi nedeniyle bir şekilde sınırlıdır (Dallman ve ark., 1987).

Dişi fareler tipik olarak erkeklerden daha yüksek bazal kortikosteron seviyelerine sahiptir ve bu fark sirkadiyen tepe noktası sırasında da daha büyüktür (Atkinson, 2004; Chun ve ark., 2015). Stres etkenine göre değişiklik göstermekle beraber genel olarak dişi sıçanlar tipik olarak aynı stres etkeni ile tehdit edildiklerinde erkek sıçanlardan daha yüksek bir HPA aksı tepkisine sahiptir (Babb ve ark., 2013). İlginç olarak nedeni bilinmemekle beraber biyoaktif kortikosteron seviyeleri dişi ve erkek sıçanlarda fark göstermezler (Droste ve ark., 2009). Bazal ve strese bağlı HPA aksı aktivitesindeki cinsiyet farkı, gonadal steroidlerin hem organizasyonel hem de aktivasyonel etkilerine bağlıdır (Becker ve ark., 2005; De Kloet, 1993; Handa ve Weiser, 2014). Gonadal steroidlerin önemli aktivasyonel rolünün bir örneği, dişi sıçanların proöstrus evresinde östrus siklusunun diğer evrelerinde olduğundan strese karşı daha büyük bir HPA aksı tepkisi olduğu yönündedir (Viau ve Meaney, 1991). Gonadal steroidlerin kadınlarda bazal ve stres kaynaklı kortizol düzeylerini etkilediğine dair bazı

kanıtlar vardır (Stephens ve ark., 2016). Genel olarak kadınlar ve erkeklerin bazal kortizol seviyeleri yakındır (Kirschbaum ve ark., 1999). Bununla birlikte, erkeklerin kortizol seviyeleri, foliküler evrede olan kadınlara kıyasla üçlü sosyal stres testi ile mücadeleden sonra daha fazla artış eğilimindedir (Stephens ve ark., 2016).

2.2.8. Kortikosteroid Reseptörleri (GR ve MR)

HPA aksı kontrolünde önemli bir adım, salgıları kontrol altında tutma ve böylece başlangıç seviyelerine geri dönme kabiliyetidir. Bu, tüm HPA aksının adrenal glukokortikoidler tarafından inhibe edilmesiyle oluşur. Negatif geri bildirimlerde rol aldığı bilinen en az iki zaman alanı vardır: Zaman gecikmeli geri bildirim ve hızlı hareket eden ve genomik olmayan geri bildirim (Keller-Wood ve Dallman, 1984).

HPA aksının negatif geri bildiriminde rol alan hipokampusta (De Kloet, 1998) ve PVN'da (Kovács ve ark., 2000; Sawchenko, 1987) yüksek oranda eksprese edilen glukokortikoid reseptörü (GR) ve mineralokortikoid reseptörü (MR) olarak iki önemli kortikosteroid reseptörü tanımlanmıştır. Glukokortikoidler beyin yalnızca HPA aksı negatif geri bildirimine katkıda bulunan bölgelerinde değil birçok beyin bölgesinden eksprese edilirler (Reul ve Kloet, 1985). ACTH salınımının glukokortikoid geri besleme inhibisyonu, organizmayı hiperkortisoleminin (kandaki aşırı kortizol konsantrasyonlarının) zararlı etkilerine karşı korur (Sapolsky, 1999; 2000). Kortikosteron deney hayvanlarında glukokortikoid-bağımlı beyin bölgelerini GR ve MR'lerin gen transkripsiyonunu direkt olarak düzenleyerek etkileyebilir (Reul ve Kloet, 1985). Mineralokortikoid reseptörleri GR'den çok daha fazla kortikosterona afinite göstermektedir (De Kloet ve ark., 1984; 1998).

Glukokortikoidlerin HPA aktivitesini düzenlemedeki merkezi etkisi temel olarak PVN'da gerçekleşmesine rağmen, noradrenerjik locus coeruleus, serotonerjik dorsal raphe ve dopaminerjik ventral tegmental alanın tümü kortikosteroid reseptörlerini eksprese eder ve antidepresan araştırmalarının odağı olmuştur. Bu üç nükleusun da GR eksprese ettiği; ayrıca dorsal raphe ve locus

coruleusun ayrıca MR eksprese ettiği bilinmektedir (Heydendael ve Jacobson, 2009). Bununla birlikte mineralokortikoidler genellikle kemirgenlerde sabah saatlerinde görölen kortizol seviyesinin düşük olduğu durumlarda eksprese edilmektedir (Bradbury ve ark., 1991). Diğer taraftan glukokortikoidler kortizol seviyelerinin dolayısıyla HPA aksının aktivasyonu ile ya da gün içinde kortizol seviyesinin en yüksek olduğu durumlarda artış göstermektedir (Reul ve ark., 1987).

Glukokortikoidler ayrıca CRF-41 ve ACTH biyosentezi ve salımı üzerinde güçlü inhibe edici etkilere sahiptir (Dostert ve Heinzl, 2004; Drouin ve ark., 1993; Imaki ve ark., 1995). HPA aksının negatif geri besleme döngüsündeki arızalar anormal kortizol seviyelerinin oluşmasına neden olabilir. Bir dizi çalışmada, PVN glukokortikoid infüzyonu, HPA ekseninin aktivasyonunun azalmasına neden olarak, PVN'in adaptif süreç için merkezi olduğunu düşündürmüştür (Kovács ve Makara, 1988; Sawchenko, 1987). PVN'daki CRF ve vazopressin nöronları glukokortikoid reseptörü eksprese ederler (Uth ve ark., 1988) ve anterior hipofiz kortikotroplarından salınan kortikosteron salınımında direkt rol oynarlar. Kortikosteron MR ve GR salınımında etkili olan kortikosteron salınımını inhibe eden hipokampus gibi ekstra-PVN bölgelerini trans-sinaptik mekanizmalar aracılığıyla (Herman ve Tasker, 2016) indirekt olarak etkilemektedir (Akana ve ark., 1986; Dallman ve ark., 1987; Kovács ve ark., 2000; Sawchenko, 1987).

Kortikosteronun PVN nöronlarına etki ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin; PVN'de GR'nin hedefli olarak silinmesinin CRF ekspresyonunu ve erkek farelerde kortikosteron ve ACTH seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Jeanneteau ve ark., 2012). 2015 yılında transgenik fare modelinde GR seviyelerindeki azalma PVN'ni hedef aldığında, kortikosteron ve ACTH seviyeleri akut strese azalırken, kronik strese azalmadığı gösterilmiştir. Böylece PVN'daki GR'lerinin negatif geri-besleme döngüsünü desteklediği gösterilmiştir. PVN'daki GR'nin azalması günlük kortikosteron düzeyini arttırmaktadır, böylece GR'nin HPA eksenini kontrolünde ve bazal seviyelerinin korunmasında da etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, transgenik dişi farelerde akut ve kronik strese bağlı

uyarılmış ACTH baskılanmaktadır ki bu durum GR negatif geri-beslenmesinin ağırlıklı olarak hipotalamusta meydana geldiğini göstermektedir (Solomon ve ark., 2015). Çalışmalarda, ön beyin GR'ünün, dişi farelerin HPA'sının düzenlenmesinde erkeklere kıyasla çok büyük bir rol oynamadığını göstermiştir çünkü PVN'da seçici GR kaybı, HPA reaktivitesinde ve kadınlarda depresyon benzeri davranışlarda çarpıcı bir artışa neden oldu (Solomon ve ark., 2012). Özetle, hipokampus, hem kortikosteroid negatif geri beslemeye aracılık ederek hem de HPA'ya endojen bir inhibitör ton uygulayarak HPA'nın modüle edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve kortikosteroid negatif geri beslemesi doğrudan PVN ve hipofiz bezine de uygulanmaktadır (Fink ve ark., 2012).

Kortizol, iki fosfolipit tabakasını pasif olarak geçebilen lipitte çözünür bir molekül olduğundan, kortizol reseptörü proteinlerin, dış hücre zarından çok hücre içinde bulunur. Endojen glukokortikoidlerin izole edilmiş ve karakterizasyonu belli olan glukokortikoid reseptör (GR) ve mineralokortikoid reseptör (MR) olmak üzere iki tip reseptörü vardır (Arriza ve ark., 1987; Hollenberg ve ark., 1985). MR ve GR genlerinin izole edilmesinden ve sekanslanmasından önce, iki ayrı hücre içi reseptörün varlığı farmakolojik çalışmalar tarafından ortaya konmuştur (McEwen ve ark., 1986). Başlangıçta Tip I kortikosteroid reseptörü olarak adlandırılan, MR'e (ki bu aynı zamanda mineraokortikoid hormonu aldosteronun birincil reseptörüdür), Tip II reseptörü ise GR'ne karşılık gelir. Her iki reseptör nükleer hormon reseptörü gen ailesinin üyeleridir ve hormona bağlı transkripsiyon faktörleri olarak işlev görürler (Mangelsdorf ve ark., 1995). Ligand yokluğunda, bu reseptörler, ısı şoku proteini 90 içeren çoklu bir protein kompleksinin bir parçasıdır (HSP-90). Bu reseptörlerin tanımlanmamış şekli ağırlıklı olarak sitoplazmada bulunur. Ligand bağlanması üzerine MR ve GR, çoklu protein kompleksi (reseptör aktivasyonu) içeren HSP-90'dan ayrışır, böylece reseptörün çekirdek içinde nükleer taşınım, birikim ve tutulmasına izin veren bir nükleer lokalizasyon alanı ortaya çıkar.

Klasik olarak, MR ve GR'nin aktive edilmiş formları homodimerleri veya heterodimerleri oluşturur ve genellikle bazı hedef genlerin promotör bölgesinin yakınında bulunan bir palindromik 15 DNA baz çifti konsensüs sekansına

(glukokortikoid yanıt elemanı, GRE) bağlanır. Bir GRE'ye MR/GR bağlanması daha sonra gen transkripsiyonunu artırabilir veya baskılayabilir. MR ve GR ayrıca, GRE bağlayan monomerler olarak hareket ederek veya diğer transkripsiyon faktörleri ile protein-protein etkileşimleri yoluyla (örneğin, fos/ Jun ya da CREB) veya transkripsiyon faktörü ko-regülatörleri (örneğin, CREB bağlayıcı protein) gibi hareket ederek gen transkripsiyonunu düzenleyebilirler (Miner ve Yamamoto, 1991; Ratman ve ark., 2013; Schiller ve ark., 2014). (Miner and Yamamoto, 1991; Schiller ve ark., 2014; Ratman ve ark., 2013) Bu monomer DNA bağlayarak ya da protein- protein etkileşimi yoluyla transkripsiyon faktörlerinin transaktivasyonel etkilerini baskılayabilir. Hem MR hem de GR, yapısal olarak benzer olsalar da, glukokortikoidlere olan ilgileri, hücresel fenotip ekspresyon seviyeleri ve işlemsel özellikleri bakımından farklılık gösterirler. Kortizolün etkilerinin büyük bir kısmı, MR/GR aracılı gen ekspresyonu değişikliğine ve genomik etkiler oluşturan değişikliklere bağlıdır. Hücrenin bu fonksiyonları nispeten uzun ömürlü ve bazen de dramatik değişikliklere neden olabilecek kadar kısa süren (saatler ve günler) bir etki mekanizmasıdır ancak hücresel fonksiyonun değişmesi gözlenmeden önce reseptör aktivasyonundan sonra tipik olarak 60 dakika gibi bir zaman gereklidir (De Kloet ve ark., 2000).

MR ekspresyonu, böbrek toplama kanallarında ve hipokampusta yüksek ekspresyon gösterir diğer yerlerdeki ekspresyonu daha kısıtlıdır (Arriza ve ark., 1988). Timus herhangi bir MR ifadesinden yoksun tek doku olabilir (Krozowski ve ark., 1989). Hem mRNA hem de protein seviyesinde MR ve GR ekspresyonu, farklı deneysel koşullara göre değişiklik gösterebilir. Reseptörler otheregülatif bir negatif düzende düzenlenir, böylece reseptörler glukokortikoidlerin yokluğunda upregüle edilirken, glukokortikoidlerin varlığında downregüle edilir (Barbu ve ark., 2015; Schmidt ve Meyer, 1994). Bununla birlikte, beyindeki reseptör seviyeleri kronik stres karşısında oldukça stabil olma eğilimindedir (Blanchard ve ark., 1995; Herman ve ark., 1999). Bu iki reseptörün gen ekspresyonu üzerinde farklı etkileri olduğu için, belirli bir hedef hücrede bulunan MR ve GR'nin belli bir oranının kortizol aktivasyonu için önemli bir faktör olma olasılığı vardır. MR/GR dengesinin, beyinde kortizolün bazı etkilerine aracılık etmede özellikle önemli

olduğu ve uygun reseptör dengesinin bozulmasının patolojik koşullara katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (De Kloet, 2014).

İnsanlarda GR'ün GR α ve GR β olmak üzere iki tip alternatif çeşitleri tanımlanmıştır (Cain ve Cidlowski, 2015). Bunlardan GR β en iyi tanımlanan tipi olup, baskın olarak sentezlenen GR α 'ya göre kortizole bağlanan proteinin bağlanma afinitesi farklı olan bir karboksi terminal aminoasit sekansına sahiptir. GR β , genel olarak ekspresyonu GR α 'ya göre düşük olmasına rağmen, in vivo baskın bir negatif GR formu olarak işlev görebilir (Cain ve Cidlowski, 2015; Pujols ve ark., 2013). Sıçanlar ve fareler, insanlarda bulunan spesifik GR β alternatifinden yoksundur (Otto ve ark., 1997). Bununla birlikte, son çalışmalar farelerde (Hinds ve ark., 2010) ve sıçanlarda (Dubois ve ark., 2013) bulunan GR'nin karboksi terminal kısmının farklı alternatif birleşme formlarını tanımlanmıştır.

2.3. Glutamaterjik Sistem

Glutamat aminoasiti merkezi sinir sisteminde en çok miktarda bulunan eksitator nörotransmitterdir (Kula ve ark., 2019). Glutamat sinyalizasyonunda serbest kalan glutamat, bir iyon akışını, depolarizasyonu ya da post-sinaptik hücrede ikinci bir heberci sinyal yolağını tetikleyen hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanır. Glutamaterjik sinaps elementlerinin pre-sinaptik ve post-sinaptik organizasyonu çok karmaşıktır: Sinaptik vezikülün füzyonunu ve geri dönüşümünü sağlamak için pre-sinaptik alanda yüzlerce protein çalışır, ayrıca sinaptik yoğunluğun ve sinaptik inputların transdüksiyonunun tespit edilmesini sağlamak için yüzlerce protein biraraya getirilir (Husi ve ark., 2000; Rosenmund, 2003).

Glutamat reseptörleri **iyonotropik (iGluR)** ve **metabotropik (mGluR)** reseptörler olmak üzere iki ana tipte sınıflandırılır (Traynelis ve ark., 2010). Presinaptik butona salınımın ardından, glutamat hızlı bir şekilde sinaptik aralığa geçer ve postsinaptik membrandaki glutamat reseptörüne bağlanır. İyonotropik ve metabotropik glutamat reseptörlerinin sinapslar üzerindeki temel fonksiyonları birbirinden tamamen farklıdır (Reiner ve Levitz, 2018). Post sinaptik düzeyde,

glutamat AMPA ve kainat reseptörlerini aktive eder ve hızlı bir depolarizasyona neden olurken, NMDA reseptörleri daha uzun süreli bir depolarizasyona neden olurken daha yavaş bir yanıt verilmesini sağlar (Traynelis ve ark., 2010).

2.3.1. İyonotropik Glutamat Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri hızlı sinaptik sinyalleme aracılığıyla ligandlanmış iyon kanallarıdır. Bunlar α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit (AMPA) reseptörleri (AMPA), N-metil-D-aspartat reseptörleri (NMDAR) ve kainat reseptörlerini (KAR) içerirler. İyonotropik reseptörler glutamat ya da spesifik reseptör agonistlerine bağlandığında, çok hızlı bir şekilde (10^{-4} – 10^{-2} sn.) aktive olurlar. Ayrıca AMPA ve kainat reseptörleri NMDA reseptörlerinden daha hızlı etki gösterirler (Reiner ve Levitz, 2018). Glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, transmembrana K^+ , Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının salınımı ve postsinaptik nöronun depolarizasyonu ile sonuçlanır. Depolarizasyon yeterince güçlüyse, postsinaptik hücrede bir aksiyon potansiyeli oluşturur (Niswender ve Conn, 2010).

NMDA reseptörleri, GluN1 adında iki zorunlu glisin bağlayıcı alt ünitesinden ve reseptöre fonksiyonel çeşitlilik kazandıran GluN2 (A-D) ve GluN3 (A-B) adında iki modülatör alt ünitelerden oluşan heterotetramerik proteinlerdir (Hansen ve ark., 2018). NMDA reseptörlerinin iyon kanallarını açabilmesi için glisin GluN1 ve glutamat GluN2'ye eşzamanlı bağlanması gerekir. NMDA reseptörlerinin bir özelliği de, iyon kanallarının istirahat durumunda hücre dışı Mg^{++} ile bloke edilmesi ve bu blokajın AMPA ya da kainat reseptörü aktivasyonu ile indüklenen depolarizasyonun ardından açılmasıdır (Hansen ve ark., 2018). AMPA ve kainat reseptörleri, homomer ya da heteromer olarak sırasıyla GluA1-4 ve GluK1-5 adında subunitlerden oluşurlar (Traynelis ve ark., 2010).

NMDA reseptör antagonistleri ile yapılan hem hayvan hem de insan çalışmalarından elde edilen veriler NMDA reseptörlerinin glutamaterjik sistemin aktivasyonunda temel bir rol oynadığını göstermektedir, çünkü blokajları sadece stresin olumsuz etkisini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda anksiyolitik ve antidepresan etkiler de oluşturur (C.-H. Chang ve ark., 2015; Ghasemi ve ark.,

2014). İlginç bir şekilde, NMDA reseptörlerinde bir antagonist olan ketamin, NMDA reseptörüyle ilişkili glisin bölgesindeki kısmi antagonist olan GLYX-13, muhtemelen AMPA reseptörlerini içeren artan nöroplastisiteden kaynaklanan antidepresan etkilerin hızlı bir şekilde geri çevrilmesini sağladığı bildirilmiştir (Cao ve ark., 2019; Lepack ve ark., 2016). Glutamat NMDA reseptörü aktivasyonu ve daha sonra hücre içi serbest $[Ca^{2+}]$ yükselmesi, ksantin oksidoredüktaz (XOR) yada NOS tarafından oluşturulan NO oluşumu yoluyla süperoksit formasyonu kaynaklı peroksinitrit oluşumu gerçekleşebilir (Kaszaki ve ark., 2012). NMDA tarafından uyarılan araşidonik asit metabolizması sırasında ortaya çıkan radikaller oksidatif hasara neden olabilir (Chang ve ark., 2008). Bu görüşe göre, NMDA reseptörlerine yönelik bir antagonist, çeşitli iltihabi ve glutamat kaynaklı nörotoksisite sırasında nöroprotektif olabilir, bu da hem akut hem de kronik enflamatuar koşullarda endojen glutamatın olası bir rolünü gösterir. Bu koşullarda, NMDA reseptörlerinin aşırı çoğalması, aşırı NO üretimi aracılığıyla nörotoksik ölümü belirlemektedir (Kaszaki ve ark., 2012).

2.3.2. Metabotropik Glutamat Reseptörleri

Metabotropik glutamat reseptörleri, membranı yedi heliksli G-protein kapılı reseptörlerdir. Moleküler yapılarının homolojisine, farmakolojik ve fizyolojik özelliklere ve ilgili sinyal iletim yollarına göre Grup I (mGluR1 ve mGluR5), Grup II (mGluR2 ve mGluR3) ve Grup III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 ve mGluR8) olarak 3 grup reseptör içerirler (Nicoletti ve ark., 2011; Niswender ve Conn, 2010).

Grup I reseptörleri fosfolipaz C'ye bağlanarak, protein kinaz C'yi uyarmak için IP₃'ü (inositol 1-4-5 trifosfat) üretir ve bunun sonucunda Ca^{++} 'un hücre içi depolardan ve diaçilgliserolden (DAG) salınmasını sağlar. Grup II ve III reseptörleri, adenilat siklaz inhibisyonu yoluyla hücre içi cAMP seviyelerini azaltır. mGlu reseptörleri, Glu ve diğer nörotransmitlerin salınmasının presinaptik düzenlemesine katılır (Nicoletti ve ark., 2011). Bu koşullarda, hipokampus, amigdala ve cingulate korteks gibi beyin bölgelerinde, stres yanıtlarında rol oynayan, glutamaterjik yollar dahil olmak üzere diğer nörotransmitter ve nöromodülatör yolların homeostazı değişebilir (Bastiaanssen ve ark., 2018).

Metabotropik glutamat reseptörleri glutamat bağlanması üzerine çeşitli hücre içi sinyal kaskadlarını tetikler ve dahili depolardan Ca^{2+} salımını indükleyebilir (Murray Sherman, 2014). Alt tipine göre değişebilmekle beraber, mGluR'ler ayrıca G-protein-kapılı K^+ kanallarının açılmasını tetikleyebilir ve hücre zarı potansiyelindeki değişiklikleri tetikleyebilir (Sherman, 2014). IGluR'lerin aksine, mGluR'ler yüzlerce milisaniyeden daha uzun süre dayanabilen uzun süreli etkiler üretir (Niswender ve Conn, 2010; Reiner ve Levitz, 2018).

mGluR'ler, sinaptik iletim ve plastisitenin modülasyonunda kritik roller oynamaktadır (Niswender ve Conn, 2010). Sinapsların postsinaptik organizasyonu çok kompleks bir yapıdadır (Sheng ve Kim, 2011). Büyük ölçekli proteomik analizlere dayanarak, post sinaptik depolarizasyon kinazlar (kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) gibi), fosfatazlar (fosfataz 1, 2A, 5, kalsinörin gibi), skaffold ya da adaptör proteinler (PSD-95, SAP-102 gibi), düzenleyici proteinler (transmembran AMPAR-düzenleyici proteinler (TARP) gibi), adhezyon molekülleri, sitoskeletal proteinler (aktin, tubulin, miyozin gibi) ve daha birçok farklı protein içerir, aralarında farklı tip glutamat reseptörleri ve sinyal molekülleri bulunur (Baucum, 2017; Collins ve ark., 2006; Lisman ve ark., 2002). Glutamat reseptörleri, sinyal iletimi proteinleri ile hücreler arası sinyal için gereken büyük çok proteinli komplekslerde toplanır (Husi ve ark., 2000). Bu kompleksler içindeki moleküler etkileşimler, sinaptik iletim ve plastisite sırasında sinapslardaki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin temelini oluşturur (Husi ve ark., 2000; Lei ve ark., 2018; Lisman ve ark., 2002; Sattler ve ark., 2018; Zhou ve ark., 2012).

2.4. Merkezi Melanokortin Sistemi ve Besin Alımı Düzenlenimi

Merkezi melanokortin sistemi iştah ve enerji homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir nöronal devredir (Cone, 2005). Bu sistem beyinde bulunan melanokortin $\frac{3}{4}$ reseptör eksprese eden hedef nöronların yanı sıra başlıca hipotalamik arkuat nükleustaki (ARC) alfa-melanosit uyarıcı hormon (alfa-MSH)/proopiomelanokortin (POMC) ya da nöropeptit Y (NPY)/agouti-ilişkili peptit (AgRP) üreten nöronları içermektedir (Cone, 2005). Merkezi melanokortin sistemi, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) üreten

nöronlar (Bariohay ve ark., 2009) gibi serotonerjik nöronlar (Heisler ve ark., 2003) dahil olmak üzere gıda alımını kontrol etmek için birçok diğer nöronal sistemle etkileşime girebilir (Sabatier ve ark., 2003; Yosten ve Samson, 2010a).

Merkezi melanokortin sistemi birçok periferel ya da leptin, alfa-MSH (Cone, 2005) ve nesfatin-1 (Oh-I ve ark., 2006) gibi hipotalamik kaynaklı anoreksijenik aktiviteye aracılık edebilir (Yosten ve Samson, 2009). Leptin (Blevins ve ark., 2004) ve nesfatin-1'i içeren (Maejima ve ark., 2009; Yosten ve Samson, 2009) diğer melanokortine bağlı beslenme peptitlerinin anoreksijenik etkisi, merkezi oksitosin sistemine bağlıdır. Merkezi melanokortin sisteminin CRF nöronları ile etkileşim içinde olduğu düşünülmektedir (Kawashima ve ark., 2008). Melanokortin agonistlerinin PVN'da CRF mRNA'sını (Lu ve ark., 2003) ve plazma ACTH seviyesinde (Dhillon ve ark., 2002) artışa yol açması bu sistemin stres koşullarından etkilenebileceğini düşündürmüştür.

2.5. Nesfatin-1

Nesfatin-1 2006 yılında bulunan son yıllarda sıkça anoreksijenik etkileri ve mekanizmaları konusunda çalışma konusu olan bir peptittir (Oh-I ve ark., 2006). Nesfatin-1 NEFA/nukleobindin 2 (NUCB2) prekürsöründen PC3/1 ve PC2 gibi prohormon dönüştürücü enzimler etkisi ile ayrılan ve gıda alımını inhibe eden bir faktördür (Oh-I ve ark., 2006). Bu enzimler etkisinde NUCB2; nesfatin-1, nesfatin-2 ve nesfatin-3 olmak üzere üç bölüme ayrılır. Bu peptitlerden sadece nesfatin-1'in biyolojik etkileri bilinmekte, diğer iki peptit bilinmemektedir (Oh-I ve ark., 2006).

Kemirgenlerde merkezi sinir sistemi dışında nesfatin-1 ayrıca yağ dokusu, gastrik mukoza, endokrin pankreatik beta hücreleri, kalp, tat tomurcukları ve üreme sistemini içeren periferel dokularda da sentezlendiği gösterilmiştir (Prinz ve Stengel, 2016; Ramanjaneya ve ark., 2010; Stengel Goebel Yakubov ve ark., 2009).

2.5.1. Nesfatin-1 ve Besin Alımı Düzenlenmesi

Nesfatin-1 ve NUCB2 ekspresyonu hem merkezi sinir sisteminde hem de periferel organlarda bulunmaktadır (Stengel ve Wang, 2013). Bu geniş dağılım NUCB2/nesfatin-1'in düşünülenden çok daha geniş etkileri olabileceğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda nesfatin-1'in insülin hassasiyetini arttırarak glikoz metabolizmasını etkilediğini göstermiştir (Li ve ark., 2013).

Nesfatin-1'in periferel infüzyonu, trigliserit ve kolesterolün adipozitesini ve plazma seviyelerini azalttığı (Yin ve ark., 2015), sıçanlarda nabız sayısını ve kan basıncı arttırdığı gösterilmiştir (Mimee ve ark., 2012). Nesfatin-1'in erkek sıçanlarda üreme aksının düzenlenmesinde etkileri çalışmalarda gösterilmiştir (Gao ve ark., 2016). Bu veriler, anoreksijenik etkilerinin dışında, nesfatin-1'in glukoz homeostazı, lipit metabolizması, kardiyovasküler fonksiyonlar ve üreme fonksiyonları, ayrıca uyku ve duyu düzenleme ile ilgili durumları da içeren daha önemli fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir (Ari ve ark., 2011; Emmerzaal ve Kozicz, 2013; Gao ve ark., 2016; Ramesh ve ark., 2017; Vas ve ark., 2013; Yin ve ark., 2015). Kemirgenlerde i.c.v. uygulama sonrası nesfatin-1'in gıda alımını baskılayabileceği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Könczöl ve ark., 2012; Oh-I ve ark., 2006; Wang ve ark., 2009).

2.5.2. Nesfatin-1 ve Stres

İlk çalışmalarda nesfatin-1'in etkileriyle uyumlu olarak ekspresyonunun sıçanlarda başlıca paraventriküler nukleus (PVN), supraoptik nukleus (SON), lateral hipotalamik alan (LHA) ve ARC gibi besleme düzenlemesinde yer alan hipotalamik çekirdeklerde bulunduğunu gösterilmiştir (Foo ve ark., 2008; Oh-I ve ark., 2006). Araştırmalar ilerledikçe, nesfatin-1'in başlangıçtaki dağılım haritası genişlemiş ve dağılımının merkezi sinir sistemde piriform, insular ve singulat korteksi içeren kortikal sistemde, limbik sistemin hipokampusunda ve beyin sapındaki soliter traktus nukleus (NTS), vagusun dorsal motor nukleusunda (DMV) da sıçanlarda (Brailoiu ve ark., 2007; Stengel ve Wang, 2013; Oh-I ve ark., 2006) ve farelerde (Stengel ve ark., 2011) bulunduğunu bildirilmiştir. Nesfatin-1'in sıçanlarda ayrıca dorsomedial hipotalamik nukleus (DMN), tuberal

hipotalamik alan, merkezi amigdaloid nukleus, Edinger-Westphal nuklues (npEW), lokus koruleus, medullar raphe nuklues ve serebellumda bulunduğu gösterilmiştir (Foo ve ark., 2008). Bu çekirdeklerin çoğu besin alımının yanında stres yanıtında da rol alan çekirdeklerdir (Wang ve Taché, 2009; Yoshida ve ark., 2010). Sıçanlarda nesfatin-1, omuriliğin duygusal otonomik tepkileri modüle eden pre-ganglionik sempatik ve parasempatik nöronlarda da ifade edilir (Lambrecht ve ark., 2009).

Nesfatin-1'in merkezi sinir sisteminde stres ve duygu durumunda etkili olan CRF, TRH, serotonin, kokain ve amfetamin-düzenleyici transkript (CART), melanosit uyarıcı hormon (MSH), melanin konsantre edici hormon (MCH), POMC, nöropeptit Y (NPY), vazopressin, oksitosin, büyüme hormon salıverici hormon (GHRH), somatostatin, nörotensin ve ürokortin gibi birçok nöropeptit ile ko-eksprese olduğu gösterilmiştir (Fort ve ark., 2008; Stengel, 2015). Ayrıca nesfatin-1'in stres ilişkili faktörler olan CRF, CART, ürokortin-1 ve NPY gibi faktörler ile ko-lokalize olması nesfatin-1'in stres ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Foo ve ark., 2008; Inhoff ve ark., 2010; Okere ve ark., 2010).

Nesfatin-1'in ayrıca kan-beyin bariyerini transmembran difüzyon yoluyla geçebileceği bildirilmiştir (Pan ve ark., 2007). Böylece endojen ya da eksojen nesfatin-1 periferik dokuları merkezi düzeyde salgılanan nesfatin-1 gibi etkileyebilir. Birlikte ele alındığında, nesfatin-1'in yaygın merkezi ve periferik dağılımı ve diğerk birçok nörotransmitter ile birlikte ortak lokalizasyonu, gıda alımının modülasyonuna ek olarak, bu peptitin birkaç düzenleme fonksiyonuna dahil olduğuna işaret etmektedir (De Souza, 1995).

Beyindeki nesfatin-1'in dağılımı üzerine yapılan çalışmalar, hipotalamus ve npEW gibi strese cevap ile ilgili birçok alan üzerine yoğunlaşmıştır (Goebel ve ark., 2009; Okere ve ark., 2010). Erkek Sprague Dawley tipi sıçan beyninde psikolojik ve fiziksel olarak zorlayan bir stres tipi olan immobilizasyon stresinin nesfatin-1 immünoreaktif nöronların c-Fos aracılığıyla aktivasyonunu SON, PVN, LC, rostral raphe pallidus (rRPa), ventrolateral medulla (VLM), ve NST'de arttırdığı gösterilmiştir (Goebel ve ark., 2009). Nesfatin-1'in sıçanlarda uyku bozukluğu indüklediği (Vas ve ark., 2013) ve korku, anksiyete-ilişkili

davranışları arttırdığı bildirilmiştir (Merali ve ark., 2008). İnsanlarda ise psikiyatrik bozukluk durumlarında nesfatin-1'in plazma veya serum konsantrasyonlarında değişiklik gerçekleşmektedir (Ari ve ark., 2011; Gunay ve ark., 2012).

Kronik stresin nesfatin-1 üzerindeki etkileri akut stres ile tutarlılık göstermemektedir. Değişken kronik hafif stres (CVMS) npEW'da nesfatin-1 nöronlarında aktivasyonu ve nesfatin-1 protein seviyelerini arttırmaktadır fakat mRNA seviyelerini Wistar dişi ve erkek sıçanlarda değiştirmemektedir (Xu ve ark., 2010). Başka bir çalışmada da kronik stresin, erkek Sprague Dawley tipi sıçanlarda plazma nesfatin-1 düzeylerinde veya hipotalamik mRNA ekspresyonunda anlamlı bir değişiklikle sonuçlanmadığı bildirilmiştir (Yin ve ark., 2015). Depresif bozukluklarda iştahta bozulma ve metabolik değişiklikler sık görülmektedir (Baxter, 2016; Ghosh ve ark., 2017) fakat bu değişikliklerin altında yatan patofizyolojik mekanizmalar ve bunların depresyon ve iştah arasındaki bağlantısı açıklığa kavuşmamıştır. Nesfatin-1 iştah ve metabolik koşulların düzenlenmesinde önemli bir işleve sahiptir, bu nedenle nesfatin-1'in depresyondaki rolü büyük ilgi çekmektedir. Depresyondaki hastaların nesfatin-1 seviyeleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca depresyon seviyesi ile nesfatin-1 düzeyleri de pozitif korelasyon göstermekle beraber erkek ve kadınlar arasında bir farklılık görülmemiştir (Ari ve ark., 2011). Depresyon nedeniyle intihar eden erkeklerde kontrollere kıyasla nesfatin-1 mRNA seviyeleri neredeyse iki kat daha yüksek olarak bulunmuştur fakat kadınlarda mRNA ekspresyonu kontrollere kıyasla üç kez daha düşük tespit edilmiştir. Bulgular depresyondaki farklı cinsiyetler üzerinde nesfatin-1'in farklı etkileri olduğunu düşündürmüştür. Obez kadın hastalarda mRNA seviyelerinin depresyon seviyesi ile nesfatin-1 seviyesinin pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Hofmann ve ark., 2013).

Yapılan klinik araştırmalarda, nesfatin-1'in kaygı davranışının mekanizmasında da rol oynama ihtimaline işaret etmektedir. Erkek insan deneklerinde yapılan klinik bir araştırma, genel anksiyete bozukluğu olan hastaların plazma nesfatin-1 düzeylerinin sağlıklı erkek kontrollerden daha düşük

olduğunu bildirmiştir (Gunay ve ark., 2012). Obez kadın hastalarda nesfatin-1 kaygı puanları yüksek olan obez kadın hastaların, düşük kaygı hastalarından daha yüksek nesfatin-1 düzeyleri gösterdiği ortaya konmuştur (Hofmann ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise yüksek kaygı puanına sahip obez kadınların kontrol grubuna göre daha yüksek nesfatin-1 seviyelerine sahip olduğu, yüksek kaygı puanına sahip erkeklerin ise daha düşük nesfatin-1 seviyesine sahip olduğu; sonuç olarak nesfatin-1'in cinsiyete özgü düzenlenim gösterdiği tespit edilmiştir (Hoffman ve ark., 2015). Ancak, hem kadınlarda hem de erkeklerde anksiyeteyi iyileştiren tedaviden sonra nesfatin-1'de önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Hofmann ve ark., 2017). Ayrıca kaygı düzeyi yüksek olan kadın anoreksiya nervoza hastalarında düşük kaygı gösterenlere göre daha yüksek nesfatin-1 plazma konsantrasyonları ve düzeylerin kaygı puanları ile pozitif korelasyonu bildirilmiştir (Hoffman ve ark., 2015). Benzer şekilde, panik bozukluğu olan hastalarda plazma nesfatin-1 seviyeleri kontrol deneklerine göre belirgin şekilde yüksek ve nesfatin-1 düzeyleri ile panik bozukluğu şiddeti arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir (Bez ve ark., 2010). Obsesif kompulsif bozukluğu olan hastalarda da nesfatin-1 düzeylerinin de arttığı, ancak Yale-Brown Obsesif Kompulsif Skala (Y-BOCS) skorları ile nesfatin-1 düzeyi arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (Bez ve ark., 2012).

Nesfatin-1'in i.c.v. enjeksiyonu, sıçanlarda ACTH ve kortizol plazma seviyelerini yükselttiği gösterilmiştir (Könczöl ve ark., 2010; Yoshida ve ark., 2010). Ayrıca PVN'da nesfatin-1 ve CRF'ün ko-lokalize olduğu üstelik nesfatin-1'in PVN-CRF nöronlarının çoğunu hiperpolarize ettiği ya da depolarize edebileceği bildirilmiştir (Yoshida ve ark., 2010). Periferik olarak uygulanan nesfatin-1'in, plazma kortizol ve hipotalamik CRF mRNA seviyesini artırarak HPA aksı hiperaktivitesini indükleyebileceği ve depresyon benzeri davranışa neden olabileceği öne sürülmüştür (Ge ve ark., 2015). İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde, nesfatin-1'in CRF'nin mRNA'sını ve protein ekspresyonunu düzenleyebileceği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018). HPA ekseninin hiperaktivitesi, depresyon mekanizmalarında önemli bir rol oynar, bu nedenle nesfatin-1'in duygu durumu üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkilerinin HPA eksenini ile ilişkili olduğunu düşünülmektedir. Nesfatin-1'in duyguları

düzenlemedeki rolünün NPY, noradrenalin (NA), 5-hidroksitriptamin (5-HT) ve melanokortin sistemi ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Price ve ark., 2007; 2008; Maejima ve ark., 2009; Yoshida ve ark., 2010; Yosten ve Samson, 2009).

Melanokortin sistemi, GABAerjik sistemi inhibe ederek anksiyojenik etkilere neden olur ve depresyonla da bağlantılıdır. Bu nedenle bazı çalışmalarda nesfatin-1'in melanokortin sistemi aktive ederek kaygıya yol açabileceğini öne sürmüştür (Yosten ve Samson, 2009). Eksojen olarak uygulanan nesfatin-1, sinaptik plastisite ve sinaptogenezin korunmasında önemli bir bileşen olan BDNF ve sinaptik plastisite ve hücre sağkalımını içeren nöronal fonksiyonların korunmasında önemli olan fosforile- ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (P-ERK1/2)'yi hipokampus ve prefrontal kortekste azaltabilmektedir (Ge ve ark., 2015). BDNF ve ERK'ler kaygı ve depresyon davranışlarının düzenlenmesi ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle nesfatin-1'in rolü, BDNF ve P-ERK1/2'nin dengesiz ifadesiyle ilişkilendirilebilir. Ayrıca, nesfatin-1 uygulanmasının, hipotalamusta, sinapsin-I ve sinaptotagmin-I'in artan mRNA ekspresyonunun eşlik ettiği Sprague Dawley tipi erkek sıçanlarda depresyon benzeri davranışa neden olabileceği de bildirilmiştir (Ge ve ark., 2015). İnsan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerine nesfatin-1 uygulaması p-ERK1/2 ve sinapsin-I protein ekspresyonlarını arttırmıştır (Chen ve ark., 2018).

Sinapsin-I ve sinaptotagmin-I sinaptik vezikül membranının esas komponentleridir ve vezikül füzyonu ve nörotransmitter salınımında önemlidirler. Aynı zamanda psikiyatrik hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Veriler nesfatin-1'in sinaptik fonksiyonu da değiştirerek duyguları etkileyebileceğini göstermektedir. Ayrıca, bazı psikiyatrik bozuklukların da bağışıklık sistemindeki bozukluklarla ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Meta-analizler, interlökin-6 (IL-6), C-reaktif protein (CRP) ve TNF- α 'nın dahil olduğu birçok enflamatuvar belirtecin depresyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Dowlati ve ark., 2010). Nesfatin-1'in kronik uygulanması, umutsuzluk davranışı ile pozitif olarak ilişkili olan plazma IL-6 ve CRP seviyelerini arttırabilir Bu da immün inflamatuvar aktivasyonun, nesfatin-1 kaynaklı duygu ve davranış değişikliklerinin patogenezinde önemli bir rol

oynayabileceğini göstermektedir (Ge ve ark., 2015).

2.6. Nöronostatin

Somatostatin ilk olarak sığır hipotalamusundan izole edilmiş ve büyüme hormonu inhibisyonundan sorumlu bir siklik tetradekapeptittir (Brazeau ve ark., 1973). Nöronostatinin ilk keşfi, somatostatin (SST) genine ait fizyolojik olarak aktif korunmuş dizilerin olabileceği fikri ile başlamıştır. SST geninin potansiyel bölünme alanlarında yapılan biyoinformatik analizler sonucu 2008 yılında Samson ve ark. tarafından “nöronostatin” keşfedilmiş ve bu molekülün C-terminalinin amidasyona uğramış formunun biyolojik olarak aktif olduğu belirlenmiştir (Samson ve ark., 2008). Nöronostatin temel olarak anoreksijenik etkileri bulunan bir tokluk molekülü olarak tanımlanmıştır (Samson ve ark., 2008; Yosten ve Samson, 2010b). Araştırmalarda somatostatin pre-pro-hormonu olarak keşfedilen 13 aminoasitlik biyolojik olarak aktif bir peptit olan nöronostatinin somatostatinden farklı olarak sıçan ön hipofizinden salgılanan bazal büyüme hormonu salıverici hormon (GHRH) ya da ghrelin tarafından uyarılan büyüme hormonunu etkilememektedir (Samson ve ark., 2008).

2.6.1. Nöronostatin’in Genel Özellikleri

İn vitro çalışmalarda da nöronostatinin, somatostatin reseptörlerini aktiveleştiremediği gösterilmiştir (Samson ve ark., 2008). Radio-immünoassay yöntemi kullanılarak yapılan değerdendirmelerde, dalak, pankreas ve beyinde, özellikle hipotalamus gibi farklı metabolik, nöronal ve gastrointestinal dokularında yüksek nöronostatin immünoreaktivitesi belirlenmiştir (Samson ve ark., 2008). Besin alımı düzenlenmesinde yer alan anterior hipotalamik periventriküler nukleusta nöronostatin varlığı bildirilmiştir (Berthoud, 2002; Dun ve ark., 2010). Doz ile ilişkili olarak i.c.v. nöronostatin enjeksiyonunun, gıda ve su alımı inhibisyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Samson ve ark., 2008).

Pankreatik langerhans adacıklarında bulunan delta hücreleri somatostatin salınımının esas kaynağıdır. İn vitro çalışmalarda etki mekanizması bilinmemekle birlikte parakrin olarak bu alandaki hücreleri etkileyerek somatostatinin langerhans adacıklarından salınan insülin ve glukagon üzerinde baskılayıcı etkileri

gösterilmiştir (Klauff ve Taborsky, 1987a, 1987b). Pankreastaki etkileri ortaya konan nöronostatinin reseptörü GPR107 ile birlikte aynı zamanda beyin, hipotalamik bazı bölgeler ve kalp gibi çeşitli organlarda da bulunduğu bildirilmiştir (Elrick ve ark., 2016; Pawson ve ark., 2014; Samson ve ark., 2008; Yosten ve ark., 2012). Nöronostatinin indirekt yolla glikoz tarafından baskılanan insülin üretimini uyararak pankreatik alfa hücrelerini etkilediği ve glukagon üretim uyardığı böylece glikoz homeostazını düzenlediği bildirilmiştir (Salvatori ve ark., 2014).

Plazma nöronostatin seviyelerinin, sirkadiyen benzeri etki gösterdiği gece boyunca hızla yükseldiği ve yeniden besleme durumundan sonra hızlıca başlangıç noktasına geri döndüğü gözlenmiştir (Elrick ve ark., 2016). Nöronostatinin kardiyotropik etkilerini, protein kinaz A aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Hua ve ark., 2009). Nöronostatinin merkezi sinir sistemindeki etkileri, otonom düzenlemeyle daha ilişkili olarak düşünülmüştür. Ancak, nöronostatinin bilinçli farelere merkezi olarak uygulanması, alfa-adrenerjik bloker fenitolamin uygulaması sonrası ortalama arter basıncında bir artışa yol açmıştır (Yosten ve ark., 2011).

Nöronostatin, kalp dokusunda özellikle de kardiyomiyositlerde kardiyak kasılma fonksiyonunu baskılamaktadır (Hua ve ark., 2009). Ayrıca nöronal migrasyon, gastrik tümör hücre proliferasyonu ve hipotalamik nöron uyarımını düzenlemektedir (Dun ve ark., 2010; Samson ve ark., 2008). Nöronostatinin, proopiomelanokortin (POMC) nöronlarının alt grubu olan ve ağrı mekanizmasında önemli olan melanokortinler ve endorfinler aracılığıyla anoreksijenik ve antidipsojenik etki gösterdiği bildirilmiştir (Yosten ve ark., 2011; Yosten ve Samson, 2010b). Çalışmalarda ayrıca merkezi olarak uygulanan nöronostatinin, melanokortin sisteminin de etkisi ile farelerde antinosiseptif etki oluşturduğu bildirilmiştir (Yang ve ark., 2011). Nöronostatin, hipotalamik nöronlarda Ca^{2+} mobilize etmektedir (Dun ve ark., 2010). Nöronostatin ve somatostatin aynı pre-pro-hormon tarafından üretilmesine rağmen somatostatin hayvanlarda anksiyete ve depresyon benzeri etkileri azaltmaktadır (Engin ve ark., 2008; Engin ve Treit, 2009).

2.7. Nöronal Aktivasyon Belirteçleri

Nöronal aktivite değişikliklerini belirlemede c-Fos gibi transkripsiyon faktörleri belirteç olarak kullanılmaktadır (Hoffman ve ark., 1993). Nöronlarda c-Fos ekspresyonu, bazal durumlarda minimal düzeyde olmasına karşın, belirli fizyolojik durumlarda artar ve bu artışın belirlenmesiyle aktive olan sistem hakkında bilgi edinilebilir. Deneysel olarak uyarılan bir nöronda sentezlenerek çekirdeğe transloke olan ve nöronda genetik aktivasyonu başlatan c-Fos proteininin immunoreaktivitesi, uyarı takip eden 60-90 dakika içerisinde belirlenebilmektedir (Eriksson ve ark., 1996).

STAT (sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri) proteinleri, transkripsiyonu aktive eden sinyal molekülleridir. İnaktif olarak sitoplazma da yer alırlar ve etkinleştince çekirdeğe geçerler. STAT proteinlerinin aktivasyonu için de amino asit rezidülerinin fosforilasyonu gereklidir. Fosforilasyon sürecinde, reseptör-bağımlı JAK tirozin kinaz sistemi görev alır. Fosforillenen STAT (pSTAT) hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edeceği çekirdeğe geçerek DNA moleküle bağlanır ve gen aktivasyonunu başlatır (Bromberg ve Darnell, 2000). Çekirdekte belirlenen pSTAT immünoreaktivitesi, o nöronun transkripsiyonel aktivasyona başladığının, yani aktive olduğunun gösterilmesi yönünde kullanılmaktadır (Zhao ve ark., 2011).

Çekirdekte lokalize bu proteinlerden biri ile birlikte, nöronun başka bir kompartımanında (sitoplazma, hücre membranı gibi) yerleşik olan ve nöronun fenotipinin belirlenmesini sağlayacak ikinci bir proteinin de immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi, hem nörondaki aktive değişiklikleri ve aktivasyon yolları hem de nöronun fenotipi hakkında bilgi verir. Çalışmalarımızda bu iki nöronal aktivasyon belirteci kullanılacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada genç erişkin (2-3 aylık), daha önce çiftleşmemiş ve deneye girmemiş, 200-250 gr ağırlığında, Spraque Dawley tipi 80 adet dişi ve 80 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 25°C oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda, *ad-libitum* olarak beslenerek; stres ve gürültüden izole bir şekilde çalışmaya alındılar.

Çalışma için Spraque Dawley tipi sıçanlar, Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek, bakımları ve deneysel uygulamaları aynı ünitelerde yapıldı. Çalışma stres deneyleri kapsamında 10 grup halinde yürütüldü. Ayrıca diğer ikili işaretlemeler için 10 dişi, 10 erkek Spraque Dawley tipi sıçanın perfüzyon fiksasyonu yöntemi ile beyin dokuları alındı.

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HADYEK) 26.02.2016 tarihli 2016- 04/05 nolu izni ile kullanıldı.

Çalışma bütçesinin tamamı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) tarafından Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 1001-116S748 numaralı projesi kapsamında karşılanmıştır.

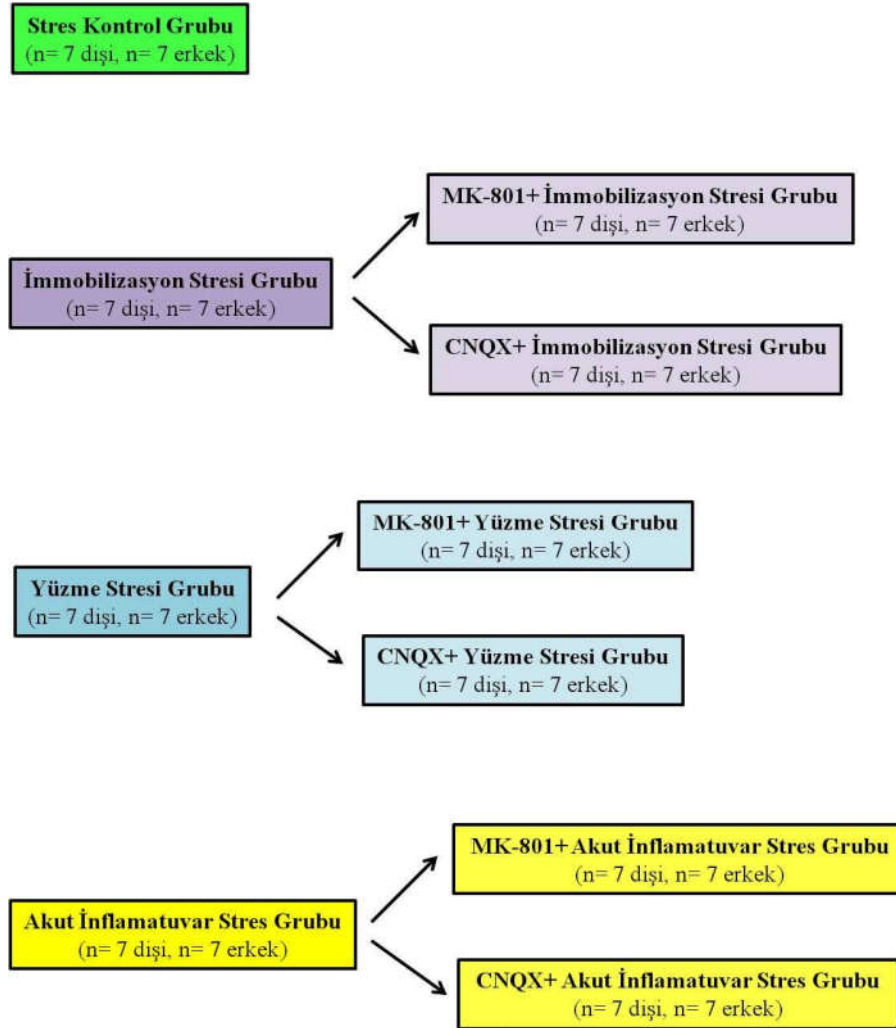
3.2. Beyin Dokularının Eldesi

Tüm deney süresince bütün sıçanlardan beyin dokularının alınması sırasında denekler kontrol amacıyla 90 dk ayrı bir kafeste tutulduktan sonra derin eter anestezisi altında toraksları açılarak, aorta kateter yerleştirmek suretiyle

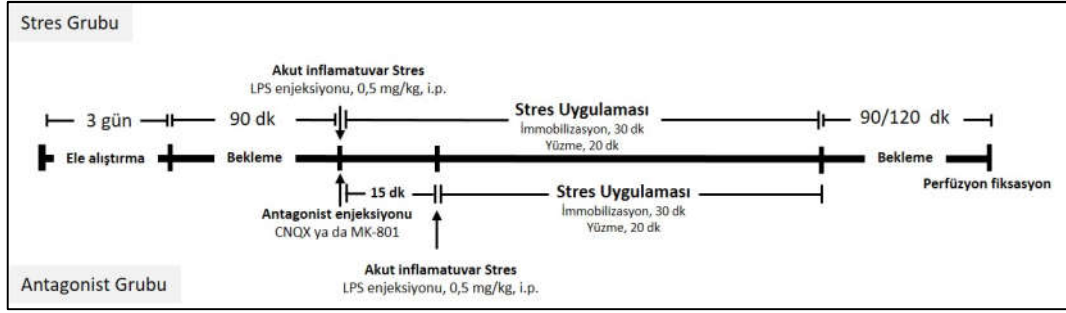
perfüzyon fiksasyon yöntemi ile sakrifiye edilmişlerdir. Perfüzyon fiksasyon işlemi sırasında perfüzyon pompası kullanılmış ve deney hayvanlarının aortasına yerleştirilen kateterden ilk olarak %0,9'luk serum fizyolojik (NaCl) gönderilerek kanları temizlenmiş, ardından taze hazırlanmış %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile fiksasyon gerçekleştirildikten sonra beyin dokuları hassas bir şekilde çıkarılmıştır.

3.3. Stres Deney Grupları

Stres deneylerinde kullanılan sıçanların gruplandırma şeması aşağıda Şekil 3'de, stres deneylerinde uygulanan prosedürlere ait şematik diyagram Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Stres deneylerindeki deney grupları ve deney hayvanı sayıları



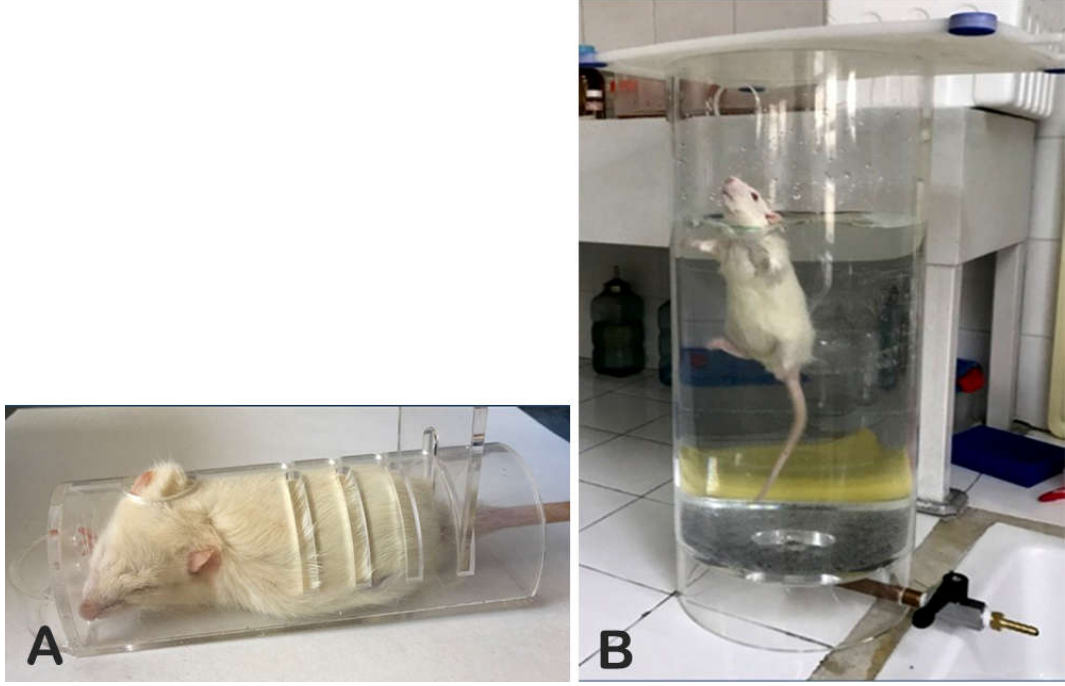
Şekil 4 . Stres deneylerinin şematik diyagramı.

3.3.1. Stres Kontrol Grubu

Stres deneylerinde kontrol amacıyla oluşturulan grupta yer alan deney hayvanlarına ele alıştırma işlemi sonrası hiç bir stres uygulaması yapılmamıştır. Denekler kontrol amacıyla 90 dk ayrı bir kafeste tutulduktan sonra derin eter anestezisi altında toraksları açılarak, aorta kateter yerleştirmek suretiyle perfüzyon fiksasyon yöntemi ile kurban edilmiştir. Bu gruptaki deneklere ait veriler stres çalışmalarının kontrol grubunu oluşturmaktadır. Bu grupta toplam 7 adet dişi ve 7 adet erkek sıçanın beyin dokuları temin edilmiş ve paraventriküler ve arkuat nükleusta c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları ve toplam nesfatin-1 nöron sayıları ve periventriküler alanda ise pSTAT5 pozitif nöronostatin nöronları ve toplam nöronostatin nöron sayıları kaydedilmiş ve ikili işaretlenme oranlarının belirleneceği mikroskopik analiz verileri elde edilmiştir.

3.3.2. İmmobilizasyon Stresi Grubu

İmmobilizasyon yani hareketsizlik stresi uygulaması için deney hayvanlarının hareket etmesini engelleyen plastik “restrainer”lar kullanılmıştır (Şekil 5A). Literatür incelenerek, plastik “restrainer”larda deney hayvanlarının ne kadar süre tutulacağının belirlenmesi için ilk çalışmalar kapsamında deney hayvanları 10 dk, 20 dk ve 30 dk tutularak deneme yapılmış ve c-Fos- nesfatin-1 ikili işaretlemesi ile sonuçlar değerlendirilerek 30 dakikalık sürenin uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5. Stres deneylerinde kullanılan düzenekler. A: Deney hayvanlarının hareketsiz kalmasını sağlayan ön tarafında ventilasyon delikleri bulunan plastik restrainer. B: Deney hayvanlarına zorla yüzdürme stresinin uygulandığı alt tarafında musluk bulunan plastik deney hayvanı yüzme su tankı.

Deney hayvanlarına 3 gün ele alıştıurma işlemi sonrası her bir deney hayvanı 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiş ardından 30 dk hareketsizlik stresi uygulanmıştır. İmmobilizasyon stresi uygulaması sonrası beyindeki nöronların aktifleşmesi için her bir deney hayvanı tekrar 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiş ve daha sonra perfüzyon işlemine geçilmiştir. Bu grupta toplam 7 adet dişi ve 7 adet erkek sıçanın beyin dokuları temin edilmiş ve paraventiküler ve arkuat nükleusta c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları ve toplam nesfatin-1 nöron sayıları ve periventriküler alanda ise pSTAT5 pozitif nöronostatin nöronları ve toplam nöronostatin nöron sayıları kaydedilmiş ve ikili işaretlenme oranlarının belirleneceği mikroskopik analiz verileri elde edilmiştir.

3.3.3. Yüzme Stresi Grubu

Yüzme stresinin uygulaması için, deney hayvanlarının üst ve alt sınırlara erişmesini engelleyecek boyutta plastik su tankı kullanılmıştır (Şekil 5B). Literatür incelenerek plastik su tankında deney hayvanlarının ne kadar süre tutulacağının belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında deney

hayvanları 5 dk, 10 dk ve 20 dk yüzdürülerek deneme yapılmış ve c-Fos- nesfatin-1 ikili işaretlemesi ile sonuçlar değerlendirilerek 20 dk sürenin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Deney hayvanlarına 3 gün ele alıştırmaya işlemi sonrası her bir deney hayvanı 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiş ardından 20 dk zorla yüzdürme stresi uygulanmıştır. Yüzdürme testi sonrası beyindeki nöronların aktifleşmesi için her bir deney hayvanı tekrar 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiş ve daha sonra perfüzyon işlemine geçilmiştir. Bu grupta toplam 7 adet dişi ve 7 adet erkek sıçanın beyin dokuları temin edilmiş ve paraventriküler ve arkuat nükleusta c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları ve toplam nesfatin-1 nöron sayıları ve periventriküler alanda ise pSTAT5 pozitif nöronostatin nöronları ve toplam nöronostatin nöron sayıları kaydedilmiş ve ikili işaretlenme oranları belirleneceği mikroskopik analiz verileri elde edilmiştir.

3.3.4. Akut İnflamatuvar Stres Grubu

Akut inflamatuvar stres uygulaması için deney hayvanlarına intraperitoneal (i.p.) lipopolisakkarit (LPS) enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon yapılacak dozun belirlenmesi için ilk olarak deney hayvanlarına 100 µg/kg, 0,5 mg/kg ve 1 mg/kg i.p. LPS enjeksiyonları yapılmıştır. İlk çalışmalar kapsamında deney hayvanlarının beyin dokularında c-Fos-nesfatin-1 ikili işaretlemesi ile sonuçlar değerlendirilerek 0,5 mg/kg ve 1 mg/kg LPS uygulamalarının uygun olduğu fakat 0,5 mg/kg LPS dozu ile 1 mg/kg LPS dozu arasında fark olmaması sebebiyle 0,5 mg/kg LPS dozunun i.p. olarak uygulanmasının uygun olduğuna karar verilmiştir.

Deney hayvanlarına 3 gün ele alıştırmaya işlemi sonrası her bir deney hayvanı 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiş ardından 0,5 mg/kg LPS i.p. olarak uygulanmıştır. LPS uygulaması sonrası beyindeki nöronların aktivasyonu için her bir deney hayvanı literatür incelemesi sonrası belirlenmiş olan 120 dk ayrı bir kafeste bekletilmiş ve daha sonra perfüzyon işlemine geçilmiştir. LPS uygulaması öncesi 0. dk, sonrası 60. dk ve 120. dk'larda sıçanların kan basıncı ve vücut ısıları kuyruktan ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Bu grupta toplam 7 adet dişi ve 7 adet

erkek sıçanın beyin dokuları temin edilmiş ve supraoptik nukleusta c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları ve toplam nesfatin-1 nöron sayıları ve periventriküler alanda ise pSTAT5 pozitif nöronostatin nöronları ve toplam nöronostatin nöron sayıları kaydedilmiş ve ikili işaretlenme oranları belirleneceği mikroskobik analiz verileri elde edilmiştir.

3.4. Glutamat Reseptör Antagonisti Uygulamaları

Glutamaterjik sistemi bloke etmek amacıyla deney hayvanlarında NMDA reseptör antagonisti olarak MK-801 ve non-NMDA reseptör antagonisti olarak 6-Ciano-7-Nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX) kullanılmıştır.

3.4.1. NMDA Reseptör Antagonisti MK-801 Uygulaması

Deney hayvanlarına 3 gün ele alıştırmaya işlemi sonrası her bir deney hayvanı 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiştir. İmmobilizasyon, yüzme ve LPS uygulamaları öncesi uygulanan stres etkenlerine glutamaterjik sistemin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla NMDA reseptör antagonisti 0,5 mg/kg MK-801 i.p. olarak uygulanmıştır.

Tüm gruplar için MK-801 uygulamasından 15 dk sonra stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Antagonist ve stres uygulamalarından sonra c-Fos aktivasyonu için immobilizasyon ve yüzme stresinde 90 dk, akut enflamatuvar stres uygulamasında ise 120 dk deney hayvanları ayrı kafeslerde bekletilmiş ve daha sonra perfüzyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Non-NMDA Reseptör Antagonisti CNQX Uygulaması

Deney hayvanlarına 3 gün ele alıştırmaya işlemi sonrası her bir deney hayvanı 90 dk ayrı bir kafeste bekletilmiştir. İmmobilizasyon, yüzme ve LPS uygulamaları öncesi uygulanan stres etkenlerine glutamaterjik sistemin etkisinin değerlendirilmesi amacıyla AMPA/Kainat reseptör antagonisti 2 mg/kg CNQX i.p. olarak uygulanmıştır.

Tüm gruplar için CNQX uygulamasından 15 dk sonra stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Antagonist ve stres uygulamalarından sonra c-Fos

aktivasyonu için immobilizasyon ve yüzme stresinde 90 dk, akut enflamatuvar stres uygulamasında ise 120 dk deney hayvanları ayrı kafeslerde bekletilmiş ve daha sonra perfüzyon uygulaması gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kesitlerin Elde Edilmesi ve Saklanması

Perfüzyonu gerçekleştirilen sıçanların beyin dokuları hassas zarar vermeden çıkarılmış elde edilen beyinlerden vibratom ile 40 µm'lik koronal seri kesitler (5 vial/beyin) alınarak kriyoprotektan solüsyonda -20°C' de immünohistokimyasal boyama yapılana kadar saklanmak üzere kaldırılmıştır.

3.6. İmmünohistokimyasal İşaretlemeler

3.6.1. Antikorların Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan Tablo 1'de belirtilen antikorlar için ikili işaretlemeler yapılmadan önce dilüsyon, inkübasyon süresi ve sıcaklığı belirleme, antijen retrieval işlemi ve endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi gibi ön işlemler gerçekleştirildi. Bu ön işlemler sonucu elde edilen değerler kısaca Tablo 2'de özetlenmiştir. Kesitlerin eldesi, saklanması ve immünohistokimyasal boyamalar sırasında kullanılan solüsyonların içeriği Tablo 3'de belirtilmiştir.

Tablo 1. İmmünohistokimyasal ve immünfloresan boyamalarda kullanılan malzemeler.

	Malzemenin adı	Üretici Firma	Katalog no
Primer Antikorlar	Anti-p-STAT5 tavşan poliklonal antikor	Cell Signaling Technology	9351
	Anti-c-Fos tavşan poliklonal antikor	Oncogene	PC-38
	Anti-nesfatin-1 tavşan poliklonal antikor	Phoenix Pharmaceuticals, Inc	H-003-22
	Anti-nöronostatin-13 tavşan poliklonal antikor	Phoenix Pharmaceuticals, Inc	H-060-50
	Anti-GR tavşan poliklonal antikor	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC-1004
	Anti-MR fare monoklonal antikor	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC-53000
	Anti-CRFR-1 keçi poliklonal antikor	ABCAM	ab59023
	Anti-CRFR-2 tavşan poliklonal antikor	ABCAM	ab175568
Sekonder Antikorlar	Biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711-065-152
	Biyotin konjuge eşek anti-guinea pig (GP) IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	706-065-148
	Biyotin konjuge eşek anti-keçi IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	706-065-148
	FITC konjuge eşek anti-tavşan IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	711-095-152
	TR konjuge eşek anti-fare IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	715-065-151
	Alexa Fluor® 488 eşek anti-tavşan IgG (H+L)	Invitrogen	A-21206
	Alexa Fluor® 488 eşek anti-keçi IgG (H+L)	Invitrogen	A-11055
Diğer Malzemeler	Lipopolysaccharide, E. coli, O55: B5	Calbiochem	1-800-222-0342
	(+) MK 801 C16H15N. C4H4O4	Ascent Scientific	APN06025-1-1
	CNQX disodyum tuzu	ABCAM	Ab120044
	DPX kapatma medyum	SIGMA	06522

Tablo 3. Çalışmada kullanılan antikorların dilüsyon, inkübasyon süre ve sıcaklıkları ve boyamalarda uygulanan ön işlemler.

Test edilen antikor	Dilüsyon	İnkübasyon süresi	İnkübasyon sıcaklıkları	Endojen Peroksidaz Aktivitesinin Bloklanması		Antijen Retrieval İşlemi	
				%H ₂ O ₂	Süre	Tampon	pH
Anti pSTAT5 tavşan poliklonal antikor	1: 2000	144 saat	+4°C	%1	20 dk	EDTA	8
Anti cFos tavşan poliklonal antikor	1:20.000	24 saat	Oda sıcaklığı	-	-	-	-
Anti nesfatin-1 tavşan poliklonal antikor	1: 40.000	24 saat	Oda sıcaklığı	-	-	-	-
Anti nöronostatin-13 tavşan poliklonal antikor	1: 4.000	72 saat	+4°C	%1	10 dk	Sodyum sitrat	6
Anti GR tavşan poliklonal antikor	1: 30.000	24 saat	Oda sıcaklığı	%1	10 dk	Sodyum sitrat	6
Anti MR fare monoklonal antikor	1: 250	72 saat	Oda sıcaklığı	%1	10 dk	EDTA	8
Anti CRFR-1 keçi poliklonal antikor	1: 100	72 saat	+4°C	%5	20 dk	Sodyum sitrat	6
Anti CRFR-2 tavşan poliklonal antikor	1: 100	72 saat	Oda sıcaklığı	%1	10 dk	Sodyum sitrat	6

Tablo 2. İmmünohistokimyasal ve immünfloresan boyamalar sırasında kullanılan solüsyonların içeriği ve hazırlanışı.

Solüsyon	İçindekiler	Hazırlanışı
0,13 M Sorenson'un Fosfat Tamponu	Solüsyon A, 46,54 gr/lit. [Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (0,13 M), (Merck)] Solüsyon B, 17,68 gr/lit. [KH ₂ PO ₄ (0,13 M), (Merck)]	pH7,4 olana kadar Solüsyon A üzerine Solüsyon B eklenir.
%4'lük Paraformaldehit	100 ml distile su 40 gr Paraformaldehit (Merck, Cat. No:104005) 1 N. NaOH (Merck) 0,13 M Sorenson'un fosfat tamponu Konsantr hidroklorik asit	Distile su ve paraformaldehit manyetik karıştırıcıda 58°C'ye kadar karıştırılarak ısıtılır. Isıtılan solüsyona 1 N. NaOH solüsyon berraklaşana kadar yavaşça eklenir. Filtre kağıdından süzülen solüsyon fosfat tampon ile 1 lt.'ye tamamlanır. Konsantr hidroklorik asit ya da 1 N. NaOH ile pH7,4'e ayarlanır.
0,05 M Tris/HCl Tamponu	Trizma base (Merck, Cat. No: 108387) 6 gr 1000 ml distile su Konsantr hidroklorik asit	Tris/HClma base ile distile su manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve konsantr hidroklorik asit ile pH7,6'ya ayarlanır.
Kriyoprotektan solüsyon	500 ml 0,05 M Tris/HCl tamponu 300 gr Sükroz (BDH, Prod. No: 302997) 300 ml Etilen glikol (BDH, Prod. No: 282966) 10 gr Polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22) 300 ml distile su	Distile su dışındaki maddeler manyetik karıştırıcıda karıştırılır ve distile su ile 1 litreye tamamlanır. Filtre kağıdından süzülür.
50 mM Tri Sodyum Sitrat Tamponu	Trinatrium sitrat pentahidrat 17,858 gr 1000 ml distile su Konsantr hidroklorik asit 1 N. NaOH (Merck)	Trinatrium sitrat pentahidrat ile distile su karıştırılır. pH6'ya konsantr hidroklorik asit ya da 1 N. NaOH ile ayarlanır.
1 mM EDTA Tamponu	Etilendiamin tetra asetik asit disodyum 2 sulu, 0,372 gr/lit. 1000 ml distile su Konsantr hidroklorik asit 1 N. NaOH (Merck)	Etilendiamin tetra asetik asit disodyum ile distile su karıştırılır. pH8'e konsantr hidroklorik asit ya da 1 N. NaOH ile ayarlanır.
Bloklayıcı Serum Solüsyonu	%10 Normal at serumu %0,1 sodyum azid %0,2 triton-X 100 900 ml 0,05 M Tris/HCl tamponu	Normal at serumu, sodyum azid, triton-X 100 belirtilen oranlarda karıştırılır. Tris/HCl tamponu ile 1000 ml tamamlanır. Filtre kağıdından süzülür.
Tris/HCl tamponda veya metanolde hazırlanmış %1 H₂O₂	1 ml %30'luk H ₂ O ₂ 29 ml 0,05 M Tris/HCl tampon ya da metanol	H ₂ O ₂ ile isteğe göre Tris/HCl tampon ya da metanol karıştırılır.
Tris/HCl tamponda veya metanolde hazırlanmış %3 H₂O₂	3 ml %30'luk H ₂ O ₂ 27 ml 0,05 M Tris/HCl tampon ya da metanol	H ₂ O ₂ ile isteğe göre Tris/HCl tampon ya da metanol karıştırılır.
ABCAM H₂O₂	20 ml 0,13 M Fosfat tampon 8 ml Methanol 80 µl Triton-X-100 2 ml %30'luk H ₂ O ₂ 25 ml Distile su	Fosfat tampon, Methanol, Triton-X-100 ve H ₂ O ₂ karıştırılır. 40 ml'ye distile su ile tamamlanır.

3.7. Stres Moleküllerinin Dağılımın İncelenmesi

Nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stres moleküllerini protein düzeyinde sentezleyip sentezlemediğinin belirlenmesi amacıyla nesfatin-1 ve nöronostatin proteinleri ile ayrı ayrı CRF, CRFR-1, CRFR-2, GR ve MR ikili işaretlemeleri yapılmıştır. Yapılan ön çalışmalar sonucunda CRF immünohistokimyasal işaretlemesi tüm denemelerimize rağmen gerçekleştirilememiştir. Fakat tartışma bölümünde de belirtildiği gibi diğer stres moleküllerinin sentezlendiğinin belirlenmesi kurduğumuz hipotezi yeterince desteklemektedir.

3.7.1. CRFR-1 Dağılımının İncelenmesi

3.7.1.1. Nesfatin-1/ CRFR-1 İkili İmmünofloresan İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C’ deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak Sodyum sitrat tamponu (pH:6) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C’de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler methanolde hazırlanmış ABCAM tarafından önerilen %5’lik H₂O₂ solüsyonunda 20 dk inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyon ile dilüe edilen anti nesfatin-1 (1:40.000) tavşan poliklonal ve anti CRFR-1 (1:100) keçi poliklonal antikorlar belirtilen dilüsyonlarda karıştırılarak 3 gece +4°C’de inkübe edildi.

- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli eşek anti tavşan FITC (1:100) ve eşek anti keçi Alexa flour 594 (1:600) sekonder antikorlar bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek kesitler 2 saat oda sıcaklığında bu karışımda inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitler lamlara yayıldı ve su bazlı kapatma medyumunu ile kapatıldı.

3.7.1.2. Nöronostatin/ CRFR-1 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme

Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C' deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak Sodyum sitrat tamponu (pH:6) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C'de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler metanolde hazırlanmış ABCAM tarafından önerilen %5'lik H₂O₂ solüsyonunda 20 dk inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla kesitler 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyon ile dilüe edilen anti nöronostatin (1:4,000) tavşan poliklonal ve anti CRFR-1 (1:100) keçi poliklonal antikorlar belirtilen dilüsyonlarda karıştırılarak 3 gece +4°C'de inkübe edildi. edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli eşek anti tavşan FITC (1:100) ve eşek anti keçi Alexa flour 594 (1:600) sekonder antikorlar bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek kesitler 2 saat oda sıcaklığında bu karışımda inkübe edildi.

- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitler lamlara yayıldı ve su bazlı kapatma medyumunu ile kapatıldı.

3.7.2. CRFR-2 Dağılımının İncelenmesi

3.7.2.1. Nesfatin-1/ CRFR-2 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C' deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Antiijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak Sodyum sitrat tamponu (pH:6) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C'de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler Tris/HCl tampon ile hazırlanmış %1'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dk inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla kesitler 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyon ile dilüe edilen anti CRFR-2 tavşan poliklonal antikor ile 1:100 dilüsyonda 3 gece oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli eşek anti tavşan Alexa flour 488 sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda 1:500 oranında dilüe edilerek 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla kesitler 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyon ile 1:40,000 oranında dilüe edilen anti nesfatin-1 tavşan poliklonal antikor ile kesitler 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.

- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli eşek anti tavşan Texas red sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:100 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitler lamlara yayıldı ve su bazlı kapatma medyumumu ile kapatıldı.

3.7.2.2. Nöronostatin/ CRFR-2 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C' deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak Sodyum sitrat tamponu (pH:6) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C'de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler Tris/HCl tampon ile hazırlanmış %1'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dk inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla kesitler 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyonu ile dilüe edilen anti CRFR-2 tavşan poliklonal antikor ile 1:100 dilüsyonda 3 gece oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli eşek anti tavşan Alexa flour 488 sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda 1:500 oranında dilüe edilerek 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla kesitler 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.

- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyon ile 1:4,000 oranında dilüe edilen anti nöronostatin tavşan poliklonal antikor ile kesitler 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli eşek anti tavşan Texas red sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:100 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitler lamlara yayıldı ve su bazlı kapatma medyumunu ile kapatıldı.

3.7.3. GR Dağılımının İncelenmesi

3.7.3.1. Nesfatin-1/ GR İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C' deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.,
- Antijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak Sodyum sitrat tamponu (pH: 6) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C'de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler tris tampon ile hazırlanmış %1'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dk inkübe edildi
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloking solüsyonunda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloking solüsyonu ile dilüe edilen anti GR tavşan poliklonal antikor ile 1:30.000 dilüsyonda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Biyotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.

- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki nukleusların işaretlenmesi için 8 dk Ni-DAB (1 gr Nikel, 12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 50 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklama solüsyonu ile dilüe edilen anti nesfatin-1 tavşan poliklonal antikor ile 1:40.000 dilüsyonda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Biyotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki sitoplazmik immün işaretlenme için 8 dk DAB (12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 25 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.

3.7.3.2. Nöronostatin/ GR İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C' deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak Sodyum sitrat tamponu (pH:6) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C'de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler tris tampon ile hazırlanmış %1'lik H₂O₂ solüsyonunda 10 dk inkübe edildi

- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloking solüsyonunda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloking solüsyonu ile dilüe edilen anti GR tavşan poliklonal antikor ile 1:30.000 dilüsyonda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Biyotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki nukleusların işaretlenmesi için 8 dk Ni-DAB (1 gr Nikel, 12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 50 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklama solüsyonu ile dilüe edilen anti nöronostatin tavşan poliklonal antikor ile 1:4.000 dilüsyonda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Biyotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki sitoplazmik immün işaretlenme için 8 dk DAB (12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 25 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.

3.7.4. MR Dağılımının İncelenmesi

3.7.4.1. Nesfatin-1/ MR İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C' deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Antijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak 1 mM EDTA tamponu (pH:8) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C'de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler tris tampon ile hazırlanmış %1'lük H₂O₂ solüsyonunda 10 dk inkübe edildi
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloking solüsyonunda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloking solüsyonu ile dilüe edilen anti MR fare monoklonal antikor (1:250) ve eşek anti tavşan nesfatin-1 (1:40.000) poliklonal antikorlar 3 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Floresan işaretli keçi anti fare Texas red sekonder antikor (1:300) ve eşek anti tavşan FITC (1:300) sekonder antikorlar bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitler lamlara yayıldı ve su bazlı kapatma medyumumu ile kapatıldı.

3.8. Stres Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

3.8.1. Nesfatin-1/ c-Fos İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C’ deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloking solüsyonunda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloking solüsyonu ile dilüe edilen anti c-Fos tavşan poliklonal antikor ile 1:20.000 dilüsyonda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Biotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor, bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki nukleusların işaretlenmesi için 8 dk Ni-DAB (1 gr Nikel, 12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 50 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklama solüsyonu ile dilüe edilen anti nesfatin-1 tavşan poliklonal antikor ile 1:40.000 dilüsyonda 1 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Biotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.

- Kesitlerdeki sitoplazmik immün işaretlenme için 8 dk DAB (12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 25 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.

3.8.2. Nöronostatin/ pSTAT5 İkili İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

- Beyin dokularından alınan 40 µm kalınlığındaki koronal kesitler indirekt immünohistokimyasal boyama için ilk olarak -20°C’ deki dondurucudan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 30 dk oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi.
- Oda sıcaklığına gelen kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Antiijenitenin geri kazandırılması amacıyla kesitler antijen retrieval işlemine tabii tutuldu. Antijen retrieval solüsyonu olarak 1 mM EDTA tamponu (pH:8) kullanıldı. Bu solüsyonda kesitler 85°C’de 30 dk inkübe edildi ardından 15 dk oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Endojen peroksidaz aktivitenin engellenmesi amacıyla kesitler metanolde hazırlanmış %1’lük H₂O₂ solüsyonunda 20 dk inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklama için 2 saat bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklama solüsyonu ile dilüe edilen anti pSTAT5 tavşan poliklonal antikor ile 1:2.000 dilüsyonda 6 gece +4°C’de inkübe edildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Biyotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki nukleusların işaretlenmesi için 15 dk Ni-DAB (1 gr Nikel, 12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 50 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10’ar dk yıkandı.

- Non-spesifik bağlanmanın engellenmesi amacıyla bloklayıcı solüsyonda bekletildi.
- Primer antikor olarak; bloklayıcı solüsyon ile dilüe edilen anti nöronostatin-13 tavşan poliklonal antikor ile 1:4.000 dilüsyonda 3 gece oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Biyotin işaretli eşek anti tavşan sekonder antikor bloklayıcı solüsyonda dilüe edilerek 1:300 dilüsyonda 2 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitler 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- ABC enzim uygulaması 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek yapıldı.
- 0,05 M Tris/HCl tamponu ile 3 kez 10'ar dk yıkandı.
- Kesitlerdeki sitoplazmik immün işaretlenme için 10 dk DAB (12,5 µg DAB, 1,3 µl H₂O₂, 25 ml Tris/HCl) uygulaması yapıldı.

3.9. Hücre Sayımı

İmmünohistokimyasal değerlendirmeler Paxinos ve Watson'ın sıçan beyin atlasında belirtilen koordinatlara göre belirlenen alanlarda yapıldı (Paxinos ve Watson, 2009). Bu bağlamda inceleme yapılan beyin çekirdekleri için beyin atlasında gösterilen (periventriküler nukleus (PeN) için bregma -0.24 mm ile -3.60 mm, arkuat nukleus (ARC) için bregma -2,12 mm ile -3,80 mm, paraventriküler nukleus (PVN) için bregma -1.32 mm ile -1,92 mm, supraoptik nukleus (SON) için bregma -0,48 mm ile -1,44 mm) koordinat aralıkları belirlendi. Her bir denek için birbirlerine eşit uzaklıkta bulunan 5 farklı seviyeden alınmış, rostro kaudal düzlemdeki koronal kesitler kullanıldı. Her bir deneğin beyin dokusundan 5 seri şeklinde alınarak cam viallerde saklanan kesitlerin her bir viali bir immünohistokimyasal boyama için kullanıldı.

Boyama yapıldıktan sonra bir vialde bulunan serideki tüm kesitler lamlara yayılıp kapatıldıktan sonra hücre sayımları Olympus BX50 foto-mikroskop ile 40X objektif kullanılarak gerçekleştirildi. Belirlenen hipotalamik çekirdeklerdeki tüm nesfatin-1 nöronları sayıldı. Nesfatin-1 işaretli nöronlar içerisinde her biri ayrı ayrı olmak üzere c-Fos, CRFR-1, CRFR-2, GR ve MR immün-pozitif olan

nöronların yüzdesi hesaplandı. Sayımlardan elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 22, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) (SPSS) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı ve gruplar arası fark değerlendirilirken P değerinin 0,05'ten küçük ($P < 0,05$) olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Nesfatin Nöronları ve Stres Molekülleri ile Yapılan İmmünohistokimyasal İşaretlemeler

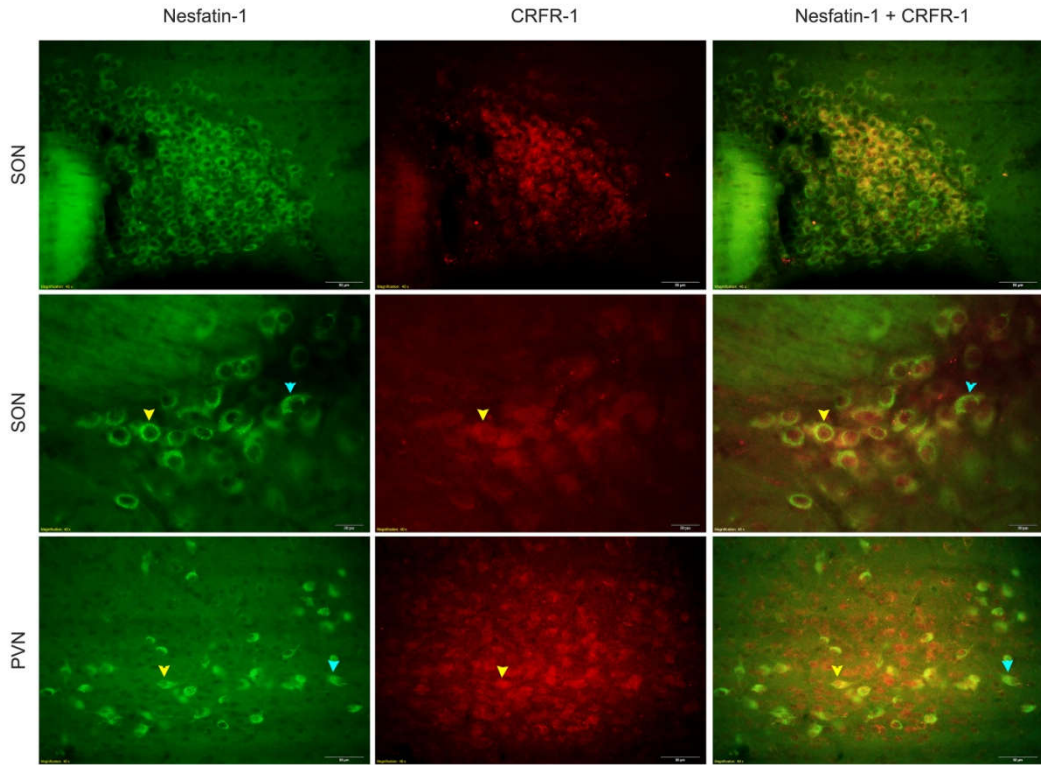
Çalışmada nesfatin-1 nöronlarının stres moleküllerini sentezleyip sentezlemediğinin araştırılması amacıyla HPA aksının beyinde bulunan stres ile ilişkili temel molekülleri olan CRF, CRFR-1, CRFR-2, GR ve MR ile nesfatin-1'in ko-ekspresyonu araştırılmıştır. CRF dışında bütün immünohistokimyasal ve immünfloresan işaretlemeler başarıyla tamamlanmıştır. CRF işaretlemesinin gerçekleşmemiş olmasına rağmen, nesfatin-1 nöronlarının stres moleküllerini sentezlediği diğer reseptör boyamaları ile gösterilmiştir. Yapılan ikili immünfloresan ve immünohistokimyasal işaretlemeler:

- Anti-nesfatin-1 ve anti-CRFR-1
- Anti-nesfatin-1 ve anti-CRFR-2
- Anti-nesfatin-1 ve anti-GR
- Anti-nesfatin-1 ve anti-MR ikili işaretlemeleridir.

Bu işaretlemelerin sonuçları aşağıda bulunmaktadır.

4.1.1. Nesfatin-1 Nöronlarında CRFR-1 Ekspresyon Değerlendirmesi

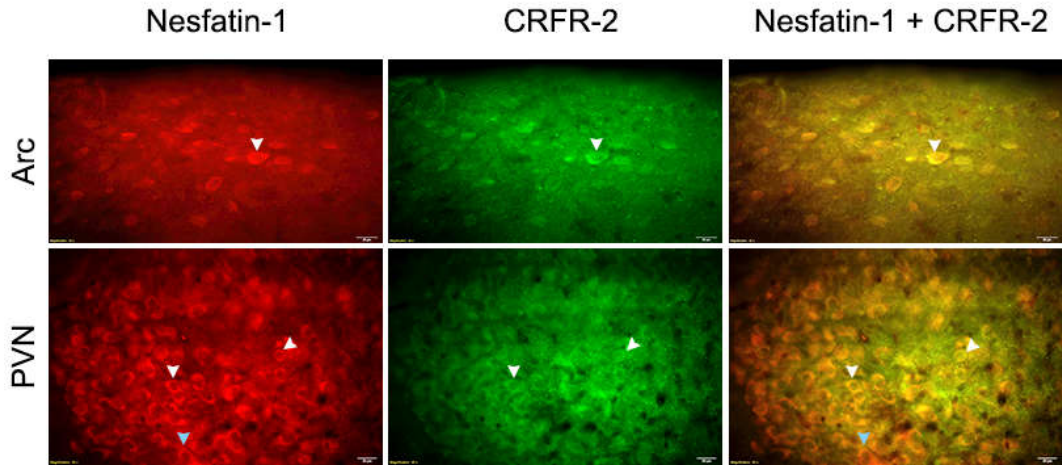
CRFR1 eksprese eden nesfatin-1 nöronları ikili immünfloresan yöntem ile incelendiğinde nesfatin-1 nöronlarının hipotalamik paraventricüler ve supraoptik nükleusta CRFR-1 ile ko-lokalize olarak bulunduğu yani PVN ve SON'da nesfatin-1 nöronlarının aynı zamanda CRFR-1 eksprese ettikleri gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. PVN ve SON'da yerleşik nesfatin nöronlarında CRFR-1 proteinini ekspresyonu. FITC ile işaretli nesfatin nöronları yeşil, Alexa flour 594 ile işaretli CRFR-1 proteinini eksprese eden nöronlar ise kırmızı renkte görülmekte. CRFR-1 reseptör proteinini eksprese eden nesfatin nöronları sarı renkte izlenmekte.

4.1.2. Nesfatin-1 Nöronlarında CRFR-2 Ekspresyon Değerlendirmesi

Nesfatin-1 nöronlarının bir stres iletim reseptörü olan CRFR-2 eksprese edip etmediği ikili immünfloresan yöntem ile incelendiğinde; başlıca PVN, ARC ve SON'da lokalize olan nesfatin-1 nöronlarının PVN ve ARC'da bulunanlarının CRFR-2 eksprese ettiği, SON'da bulunanların ise CRFR-2 eksprese etmediği belirlenmiştir (Şekil 7).

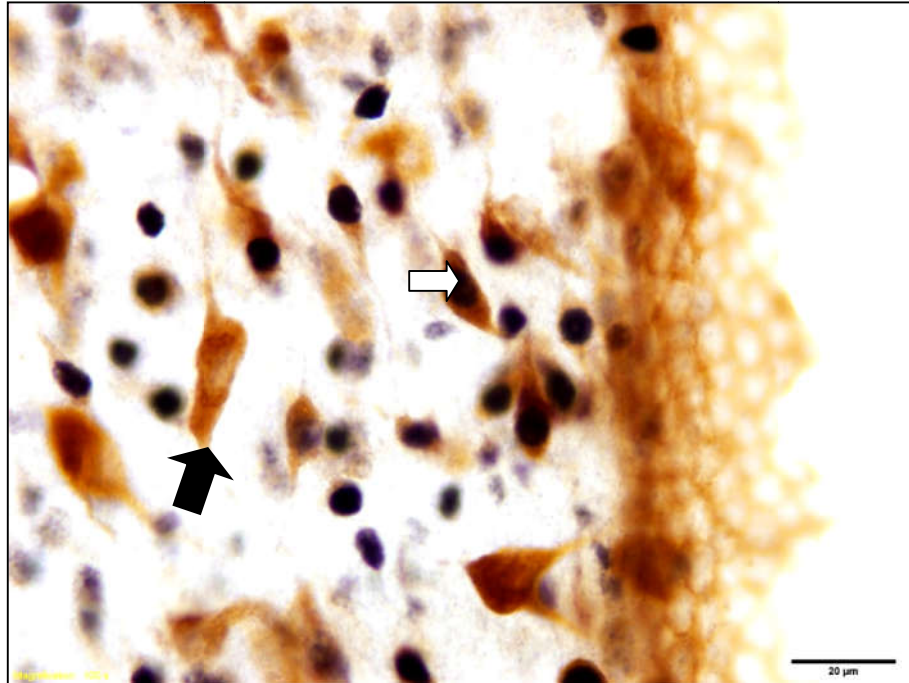


Şekil 7. PVN ve ARC'da yerleşik nesfatin nöronlarında CRFR-2 proteini ekspresyonu. Texas Red ile işaretli nesfatin nöronları kırmızı, Alexa 488 ile işaretli CRFR-2 proteinini eksprese eden nöronlar ise yeşil renkte görülmekte. CRFR-2 reseptör proteinini eksprese eden nesfatin nöronları sarı renkte izlenmekte.

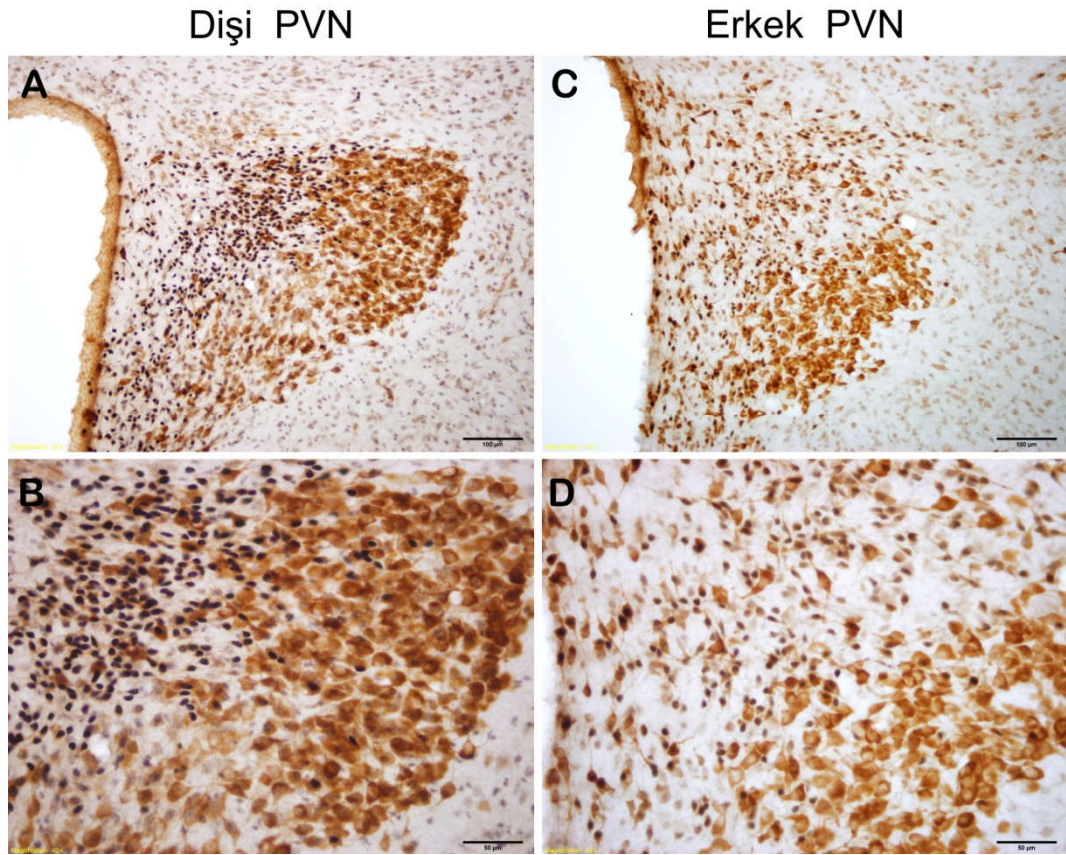
4.1.4. Nesfatin-1 Nöronlarında GR Ekspresyon Değerlendirmesi

GR eksprese eden nesfatin-1 nöronları (Şekil 8) başlıca hipotalamik paraventriküler nukleus ve arkuat nukleusta lokalize olarak bulundu. Paraventriküler nukleus değerlendirildiğinde; GR eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi dişi sıçanlarda %33,31, erkek sıçanlarda ise %29,24 olarak belirlendi (Şekil 9, 10). Arkuat nukleus değerlendirildiğinde ise; GR eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi dişi sıçanlarda %38,43, erkek sıçanlarda ise %21,90 olarak belirlendi (Şekil 11, 12).

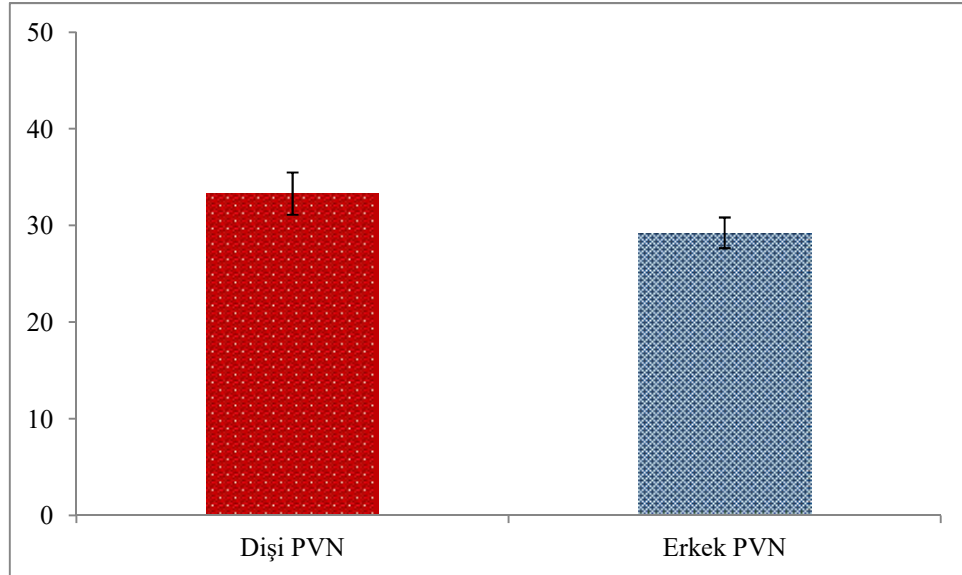
Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında PVN ve ARC birlikte değerlendirildiğinde tüm GR pozitif nesfatin-1 nöronları bakımından dişilerdeki ekspresyon erkek sıçanlardan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,014$). Çekirdekler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise yalnızca arkuat nukleusta GR-eksprese eden nesfatin-1 nöron yüzdesi dişi sıçanlarda erkek sıçanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,028$). GR ve nesfatin-1 ko-lokalizasyonu supraoptik nukleus ve lateral hipotalamik alanlarda görülmedi.



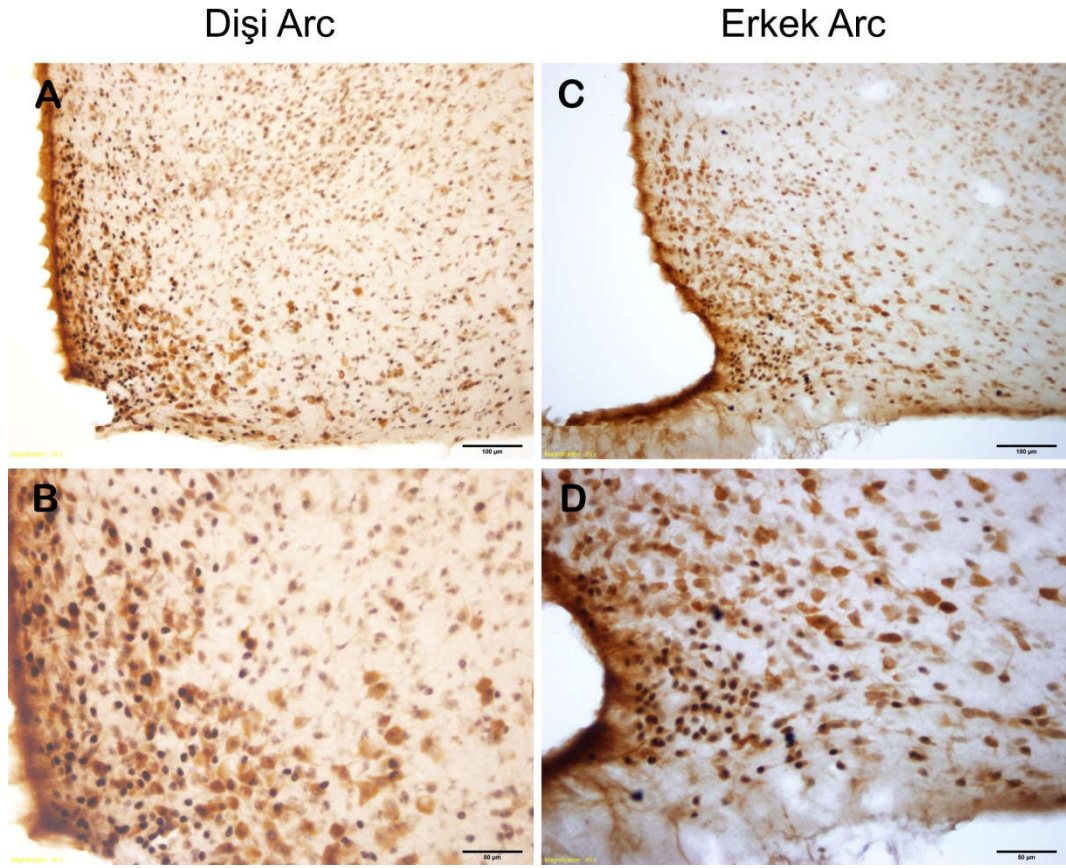
Şekil 8. Paraventriküler nukleusta GR- Nesfatin-1 ko-lokalizasyonu. Beyaz oklar ikili işaretlenen nesfatin-1 nöronlarını göstermektedir. Siyah ok GR eksprese etmeyen nesfatin-1 nöronunu göstermektedir (1000X).



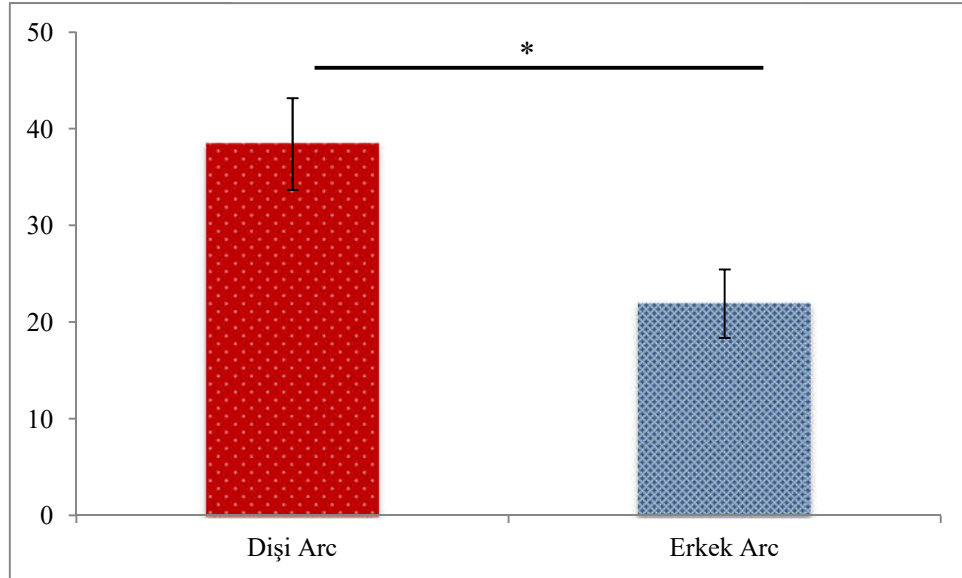
Şekil 9. Dişi (A ve B) ve erkek (C ve D) deney hayvanlarında paraventriküler nukleusta GR-Nesfatin-1 ko-lokalizasyonu. (A ve C; 200X, B ve D; 400X).



Şekil 10. Dişi ve erkek deney hayvanlarında paraventriküler nukleusta GR pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi karşılaştırması. Dişi PVN %33,31±2,19, Erkek PVN %29,24±1,59. Gruplar arasında GR pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi bakımından anlamlı farklılık görülmemiştir.



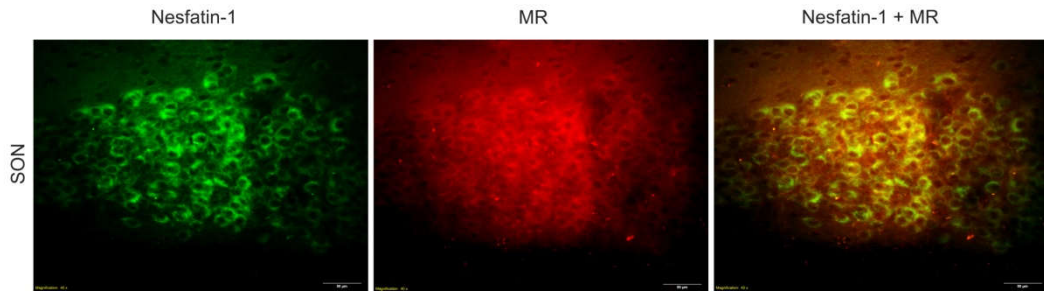
Şekil 11. Dişi (A ve B) ve erkek (C ve D) deney hayvanlarında arkuat nukleusta GR- Nesfatin-1 ko-lokalizasyonu. (A ve C; 200X, B ve D; 400X).



Şekil 12. Dişi ve erkek deney hayvanlarında arkuat nukleusta GR pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi karşılaştırması. Dişi ARC %38,43±4,75, Erkek ARC %21,9±3,55. Dişi deney hayvanlarında GR pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi erkek deney hayvanlarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

4.1.5. Nesfatin-1 Nöronlarında MR Ekspresyon Değerlendirmesi

Nesfatin-1 nöronlarının bir stres iletim reseptörü olan MR eksprese edip etmediği ikili immünfloresan yöntem ile incelendiğinde; başlıca PVN, ARC ve SON'da lokalize olan nesfatin-1 nöronlarından SON'da bulunanlarının MR eksprese ettiği, PVN ve ARC'da bulunanların ise MR eksprese etmediği belirlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. SON'da yerleşik nesfatin nöronlarında MR proteini ekspresyonu. FITC ile işaretli nesfatin nöronları yeşil, Texas Red ile işaretli MR proteinini ekprese eden nöronlar ise kırmızı renkte görülmekte. MR reseptör proteinini ekprese eden nesfatin nöronları sarı renkte izlenmekte. (200X).

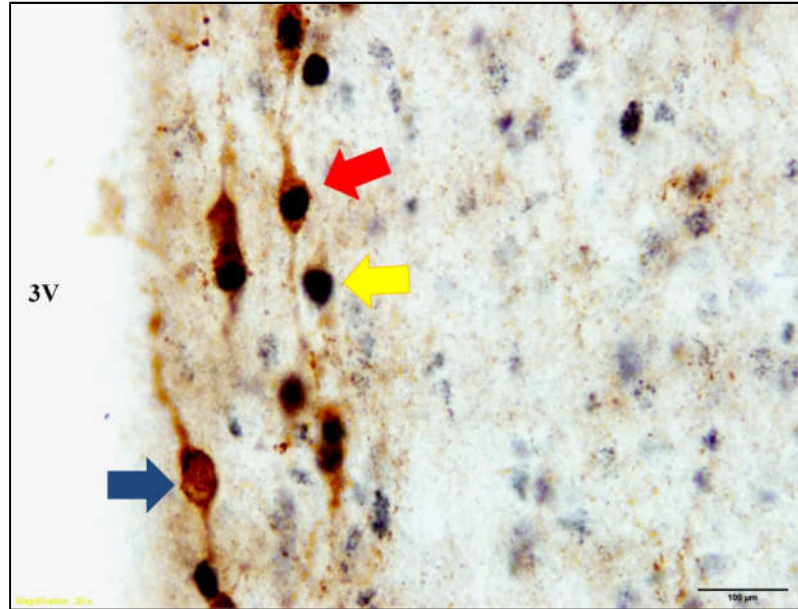
4.2. Nöronostatin Nöronları ve Stres Molekülleri ile Yapılan İmmünohistokimyasal İşaretlemeler

Nöronostatin nöronlarının stres moleküllerini sentezleyip sentezlemediğinin araştırılması için anti-nöronostatin ve anti-CRF, anti-CRFR-1, anti-nöronostatin ve anti-CRFR-2, anti-nöronostatin ve anti-GR, anti-nöronostatin ve anti-MR ikili işaretlemeleri yapıldı. CRF dışında bütün immünohistokimyasal ve immünfloresan işaretlemeler başarıyla tamamlanmıştır. CRF işaretlemesinin gerçekleşmemiş olmasına rağmen, nöronostatin nöronlarının immünfloresan olarak değerlendirilen CRFR-1, CRFR-2 ve MR eksprese etmediği fakat immünohistokimyasal olarak incelenen GR eksprese ettiği saptanmıştır (Şekil 14).

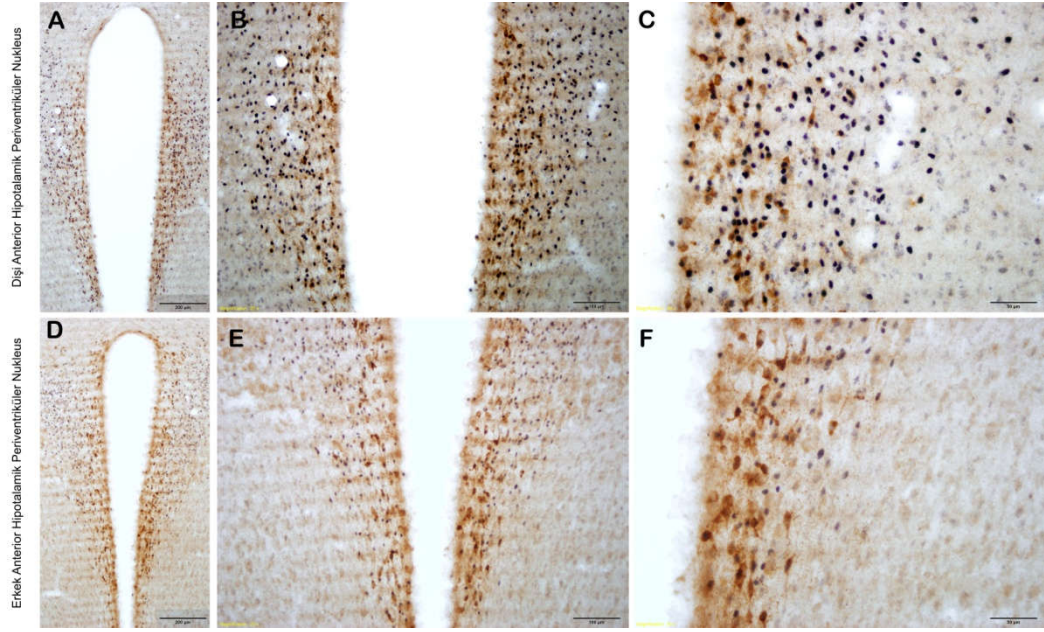
4.2.1. Nöronostatin Nöronlarında GR Ekspresyon Değerlendirmesi

GR eksprese eden nöronostatin nöronları başlıca hipotalamik periventriküler nukleusta lokalize olarak bulundu (Şekil 14). Periventriküler nukleus değerlendirildiğinde; GR eksprese eden nöronostatin nöronlarının yüzdesi dişi sıçanlarda %39,11, erkek sıçanlarda ise %39,92 olarak belirlendi (Şekil 15).

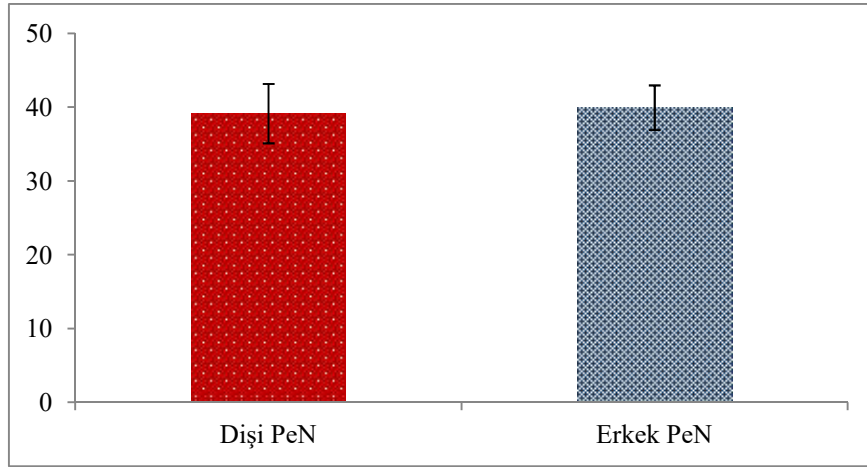
Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında periventriküler nukleusta GR-eksprese eden nöronostatin nöron yüzdesi bakımından dişi ve erkek sıçanlar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,841$) (Şekil 16).



Şekil 14: Kontrol deney hayvanlarında nöronostatin/GR ikili immünohistokimyasal işaretlemeleri. GR pozitif nöron çekirdekleri siyah renkli (sarı ok) ve nöronostatin pozitif hücre sitoplazmaları kahverengi renkli (mavi ok) olarak görülmektedir. GR eksprese eden nöronostatin nöronları kırmızı ok ile gösterilmiştir.



Şekil 15. Dişi (A:40X, B:100X C:200X) ve erkek (D:40X, E:100X, F:200X) deney hayvanlarında periventriküler nukleusta GR- Nöronostatin ko-lokalizasyonu.

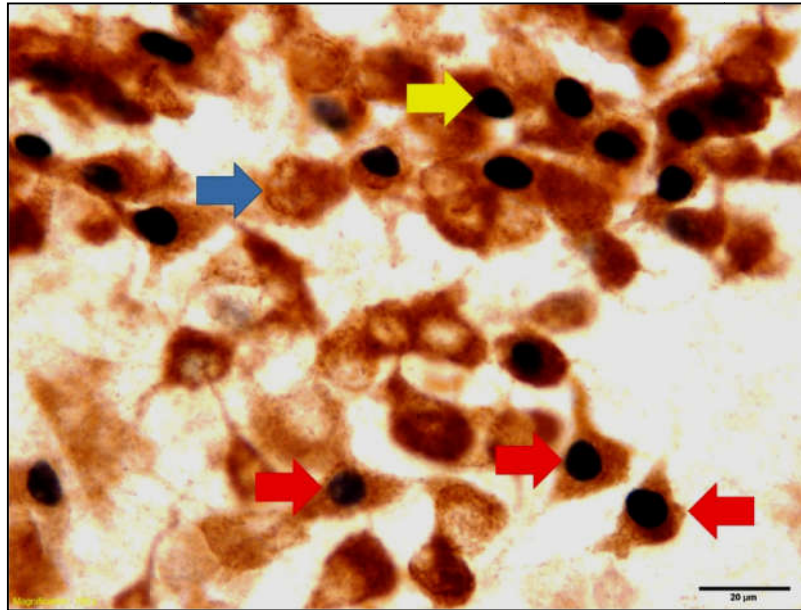


Şekil 16. Dişi ve erkek deney hayvanlarında arkuat nukleusta GR pozitif nöronostatin nöron yüzdesi karşılaştırması. Dişi PeN %39,11±4,02, Erkek PeN %39,92±3,03. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

4.3. Stresin Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

Stres grubu deney hayvanlarında (n=140; 70 dişi/70 erkek) nesfatin-1/c-Fos antikorlarıyla yapılan immünohistokimyasal işaretlemelede c-Fos pozitif nöronların nukleusları nikel DAB ile siyah renkte işaretlendi ve aynı kesitlerde nesfatin-1 pozitif nöronların sitoplazmaları DAB ile kahverengi renkte işaretlendi (Şekil 17). Hem sitoplazmik hem de nukleus boyanmasına sahip nöronlar ikili işaretlenmiş olarak değerlendirildi.

Stres kontrol grubundaki deney hayvanlarında hipotalamusun paraventricüler nukleus (PVN), arkuat nukleus (ARC) ve supraoptik nukleusundaki (SON) c-Fos ile ko-lokalize olan nesfatin-1 nöronlarının oranları belirlenirken, immobilizasyon ve yüzme stresi grubunda PVN ve ARC, akut enflamatuvar stres grubunda ise SON değerlendirildi ve karşılaştırıldı.

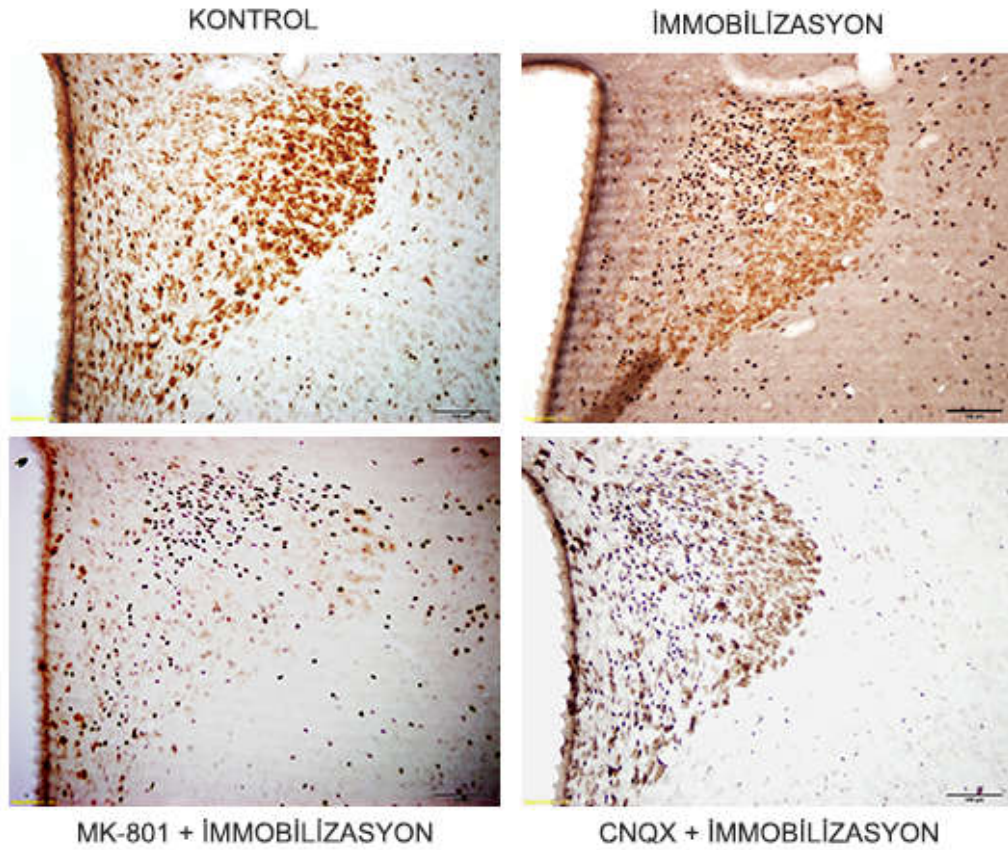


Şekil 17: Stres gruplarında nesfatin-1/c-Fos ikili immünohistokimyasal işaretlemeleleri. c-Fos pozitif nöron çekirdekleri siyah renkli (sarı ok) ve nesfatin-1 pozitif hücre sitoplazmaları kahverengi renkli (mavi ok) olarak görülmektedir. C-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronları yani aktive olmuş nesfatin-1 nöronları kırmızı ok ile gösterilmiştir.

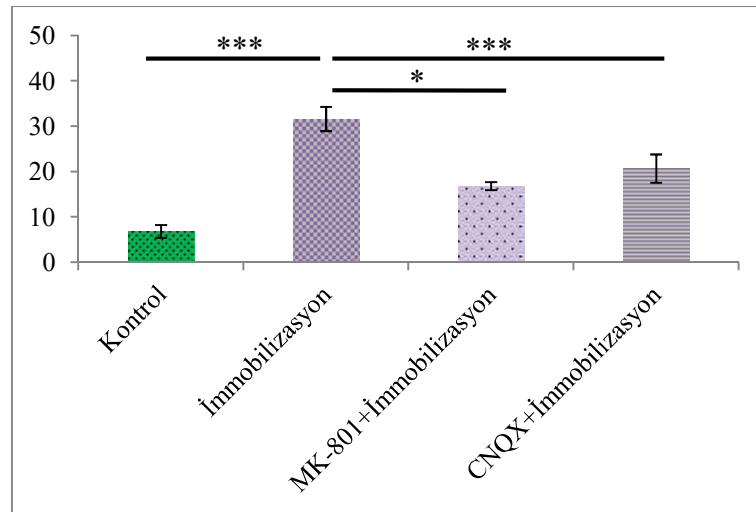
4.3.1.1. İmmobilizasyon Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Paraventriküler Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

İmmobilizasyon stresinin dişi sıçanlarda PVN'daki nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyona etkisinin ve aktivasyondaki glutamat reseptörlerinin rolünün ortaya konması amacıyla yapılan sayımlarda; dişi sıçanlarda PVN'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %6,79, immobilizasyon stresi grubunda %31,59, MK-801+immobilizasyon grubunda %16,78, CNQX+immobilizasyon grubunda %20,65 olarak bulunmuştur (Şekil 18). İstatistiksel değerlendirmelerde; kontrol grubu ile kıyaslandığında immobilizasyon stresi uygulamasının dişi sıçanların PVN'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu arttırdığı ($p=0,001$) gösterilmiştir. İmmobilizasyon stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın kontrol grubuna benzer şekilde tekrar MK-801 ($p=0,001$) ve CNQX ($p=0,017$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 19).

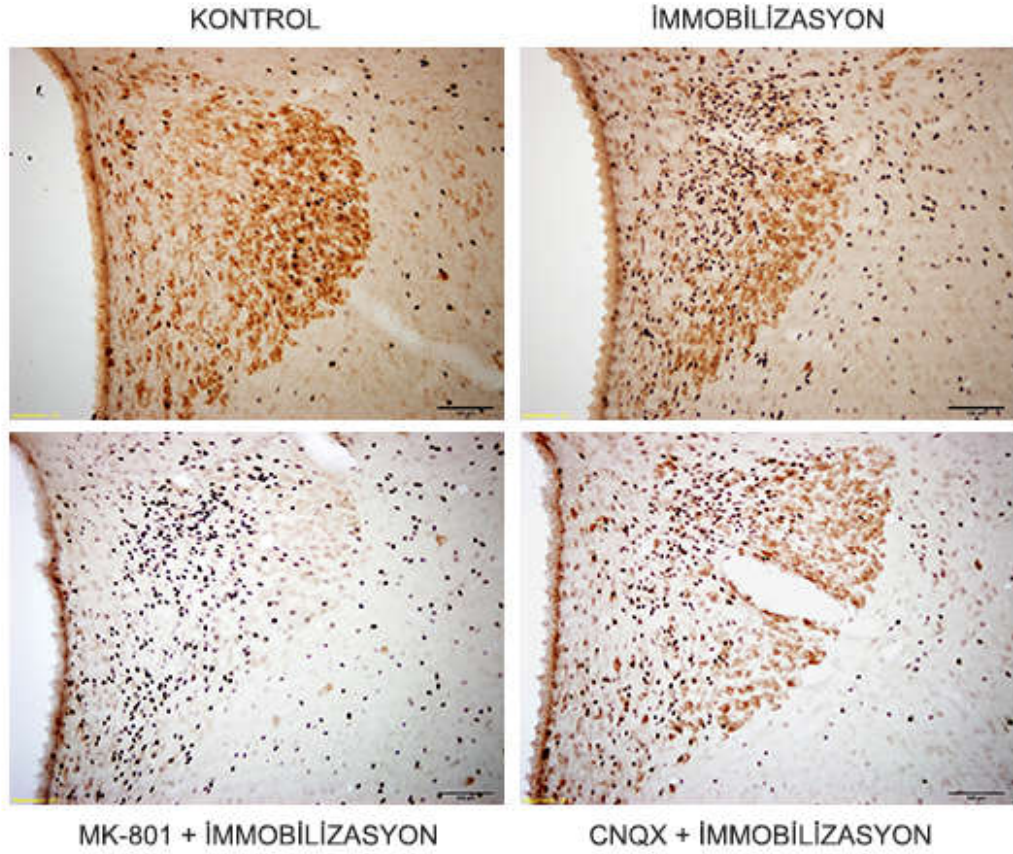
Erkek sıçanlarda ise PVN'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %9,90, immobilizasyon stresi grubunda %31,36, MK-801+immobilizasyon grubunda %21,06, CNQX+immobilizasyon grubunda %18,72 olarak bulunmuştur (Şekil 20). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu ile kıyaslandığında immobilizasyon stresi uygulamasının erkek deney hayvanlarının da dişilerde olduğu gibi PVN'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu arttırdığı ($p=0,001$) gösterilmiştir. İmmobilizasyon stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın tekrar MK-801 ($p=0,026$) ve CNQX ($p=0,011$) gruplarında kontrol grubuna benzer şekilde tekrar anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 21).



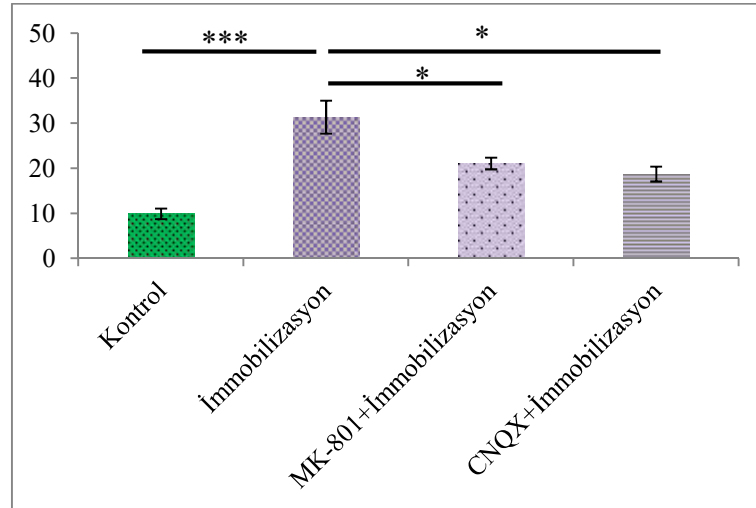
Şekil 18. İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).



Şekil 19. İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %6,79±1,42, İmmobilizasyon stresi grubu %31,59±2,67, MK-801+İmmobilizasyon stresi grubu %16,78±0,87, CNQX+İmmobilizasyon stresi grubu %20,65±3,12.



Şekil 20. . İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).

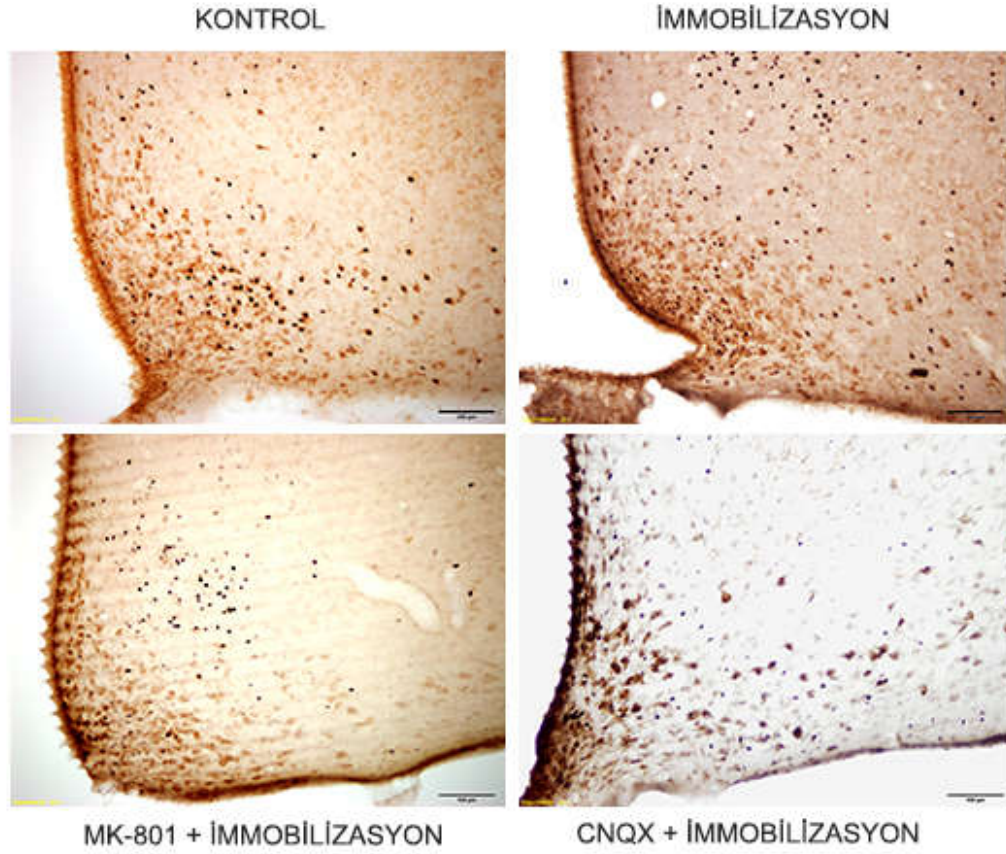


Şekil 21. İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %9,90±1,17, İmmobilizasyon stresi grubu %31,36±3,67, MK-801+İmmobilizasyon stresi grubu %21,06±1,29, CNQX+İmmobilizasyon stresi grubu %18,72±1,65.

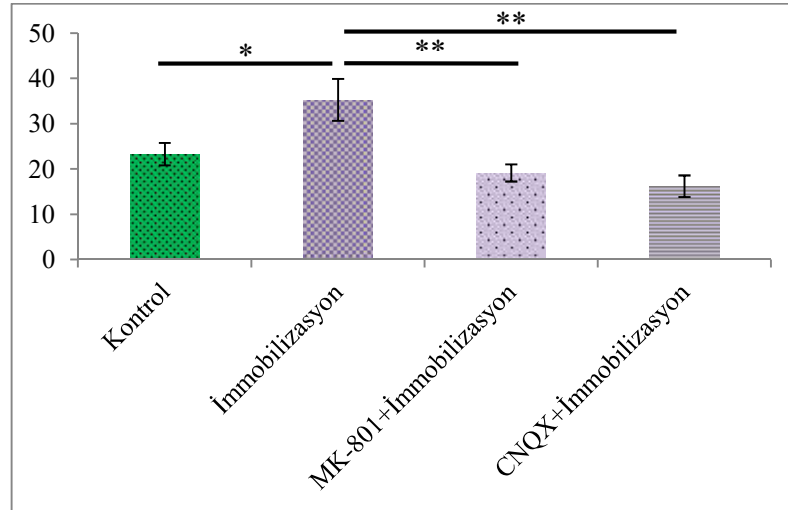
4.3.1.2. İmmobilizasyon Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Arkuat Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

İmmobilizasyon stresi uygulamasının dişi sıçanlarda ARC'daki nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyona etkisinin ve bu aktivasyondaki glutamat reseptörlerinin rolünün ortaya konması amacıyla yapılan hücre sayımlarında; dişi sıçanlarda ARC'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %23,28, immobilizasyon stresi grubunda %35,26, MK-801+immobilizasyon grubunda %19,13, CNQX+immobilizasyon grubunda %16,19 olarak bulunmuştur (Şekil 22). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu deney hayvanları ile kıyaslandığında immobilizasyon stresi uygulamasının dişi sıçanların ARC'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu arttırdığı ($p=0,038$) gösterilmiştir. İmmobilizasyon stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın kontrol grubuna benzer şekilde tekrar MK-801 ($p=0,002$) ve CNQX ($p=0,004$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 23).

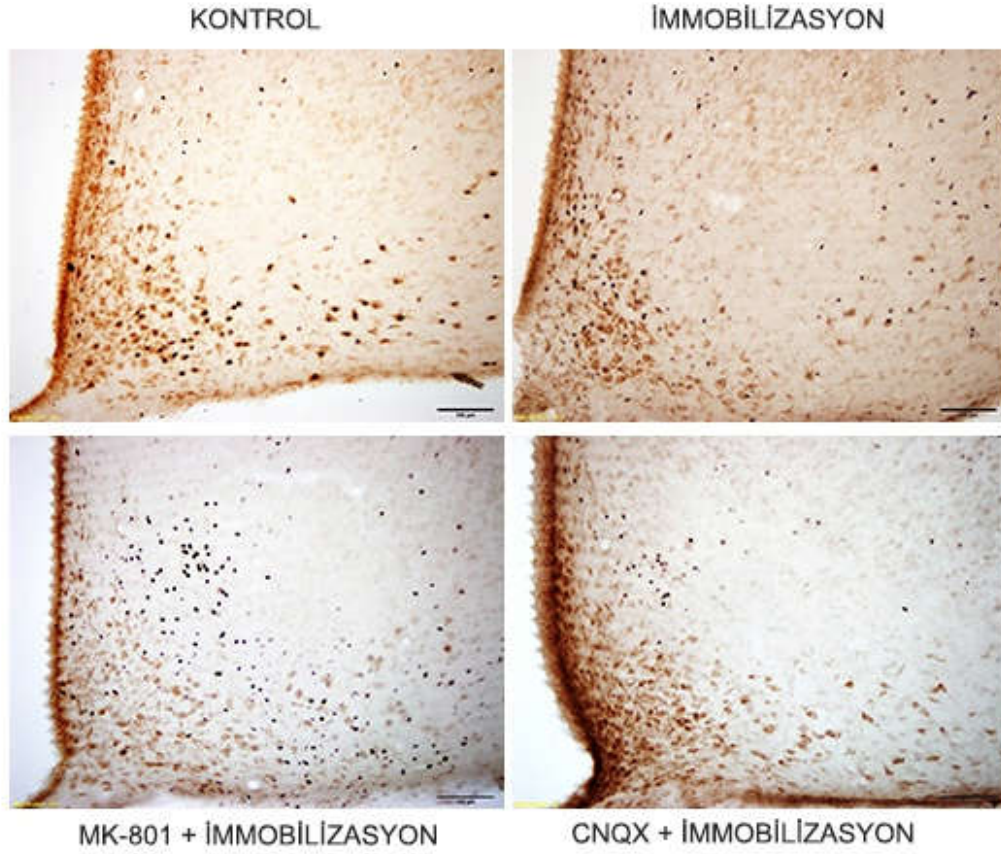
Erkek sıçanlarda ise ARC'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %22,90, immobilizasyon stresi grubunda %27,91, MK-801 ve immobilizasyon stresi uygulanan grupta %17,35, CNQX ve immobilizasyon stresi uygulanan grupta %15,02 olarak bulunmuştur (Şekil 24). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu deney hayvanları ile kıyaslandığında immobilizasyon stresi uygulamasının erkek sıçanların ARC'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu arttırdığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0,165$) görülmüştür. İmmobilizasyon stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın kontrol grubuna benzer şekilde tekrar MK-801 ($p=0,001$) ve CNQX ($p=0,001$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 25).



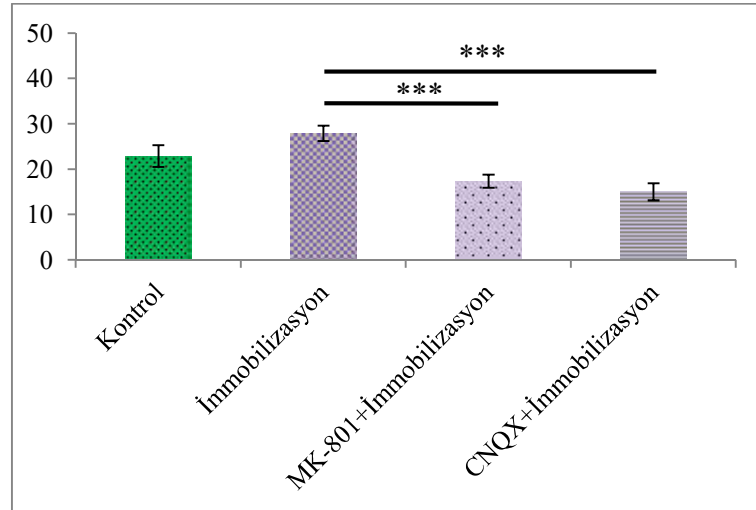
Şekil 22. İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin arkuat nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).



Şekil 23. İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin arkuat nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %23,28±2,46, İmmobilizasyon stresi grubu %35,26±4,63, MK-801+İmmobilizasyon stresi grubu %19,13±1,89, CNQX+İmmobilizasyon stresi grubu %16,19±2,40.



Şekil 24. . İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin arkuat nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).

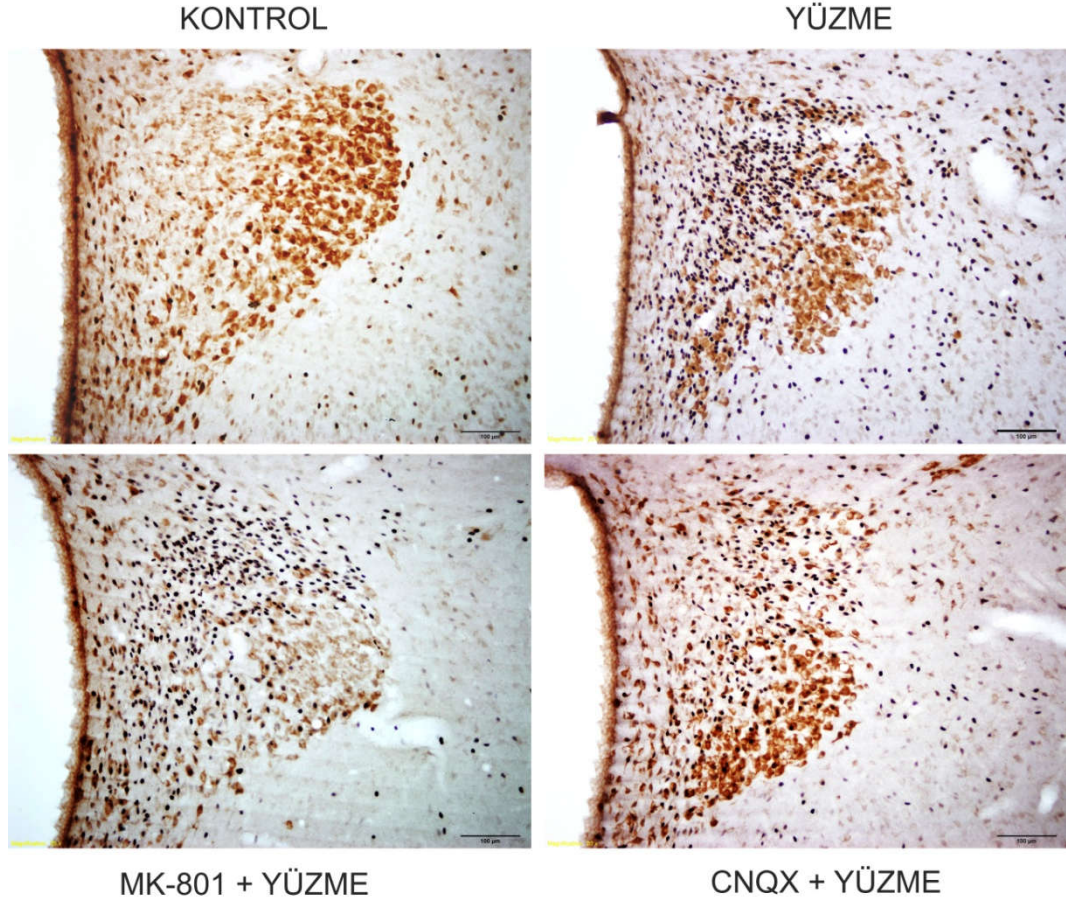


Şekil 25. İmmobilizasyon stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin arkuat nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %22,90±2,42, İmmobilizasyon stresi grubu %27,91±1,71, MK-801+İmmobilizasyon stresi grubu %17,35±1,43, CNQX+İmmobilizasyon stresi grubu %15,02±1,90.

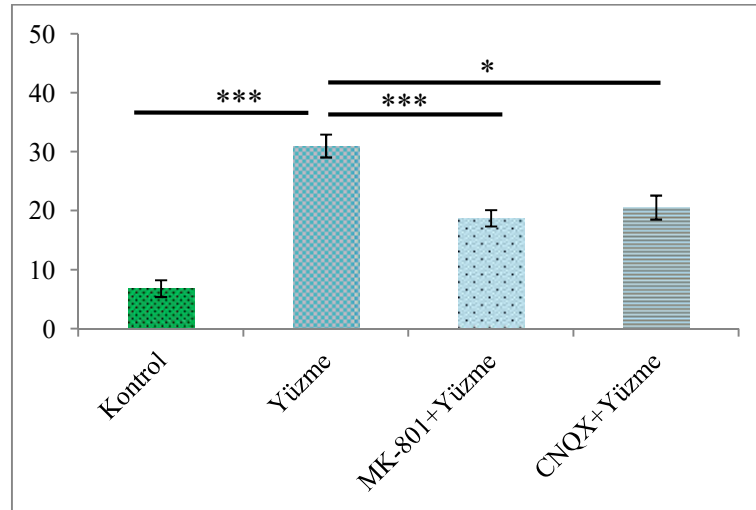
4.3.2.1. Yüzme Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Paraventriküler Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

Zorla yüzdürme stresi uygulamasının dişi sıçanlarda PVN'daki nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyona etkisinin ve bu aktivasyondaki glutamat reseptörlerinin rolünün ortaya konması amacıyla yapılan hücre sayımlarında; dişi sıçanlarda PVN'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %6,79, yüzme stresi grubunda %30,98, MK-801+yüzme grubunda %18,72, CNQX+yüzme grubunda %20,54 olarak bulunmuştur (Şekil 26). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu deney hayvanları ile kıyaslandığında yüzme stresi uygulamasının dişi sıçanların PVN'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı ($p=0,001$) ayrıca yüzme stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın tekrar kontrol grubuna benzer şekilde MK-801 ($p=0,001$) ve CNQX ($p=0,011$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 27).

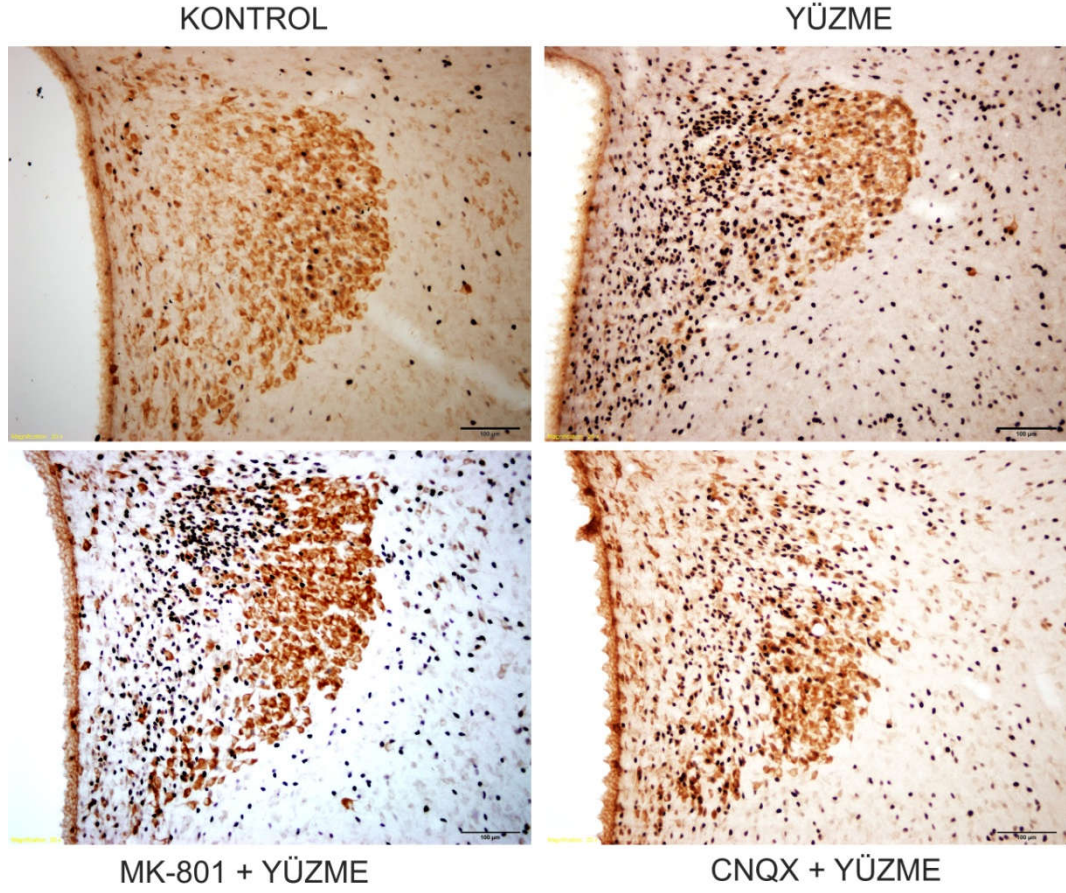
Erkek sıçanlarda ise; PVN'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %9,90, yüzme stresi grubunda %28,47, MK-801 ve yüzme stresi uygulanan grupta %17,82, CNQX+yüzme grubunda %16,23 olarak bulunmuştur (Şekil 28). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu deney hayvanları ile kıyaslandığında yüzme stresi uygulamasının erkek sıçanların PVN'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı ($p=0,001$) ayrıca yüzme stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın tekrar kontrol grubuna benzer şekilde MK-801 ($p=0,001$) ve CNQX ($p=0,001$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 29).



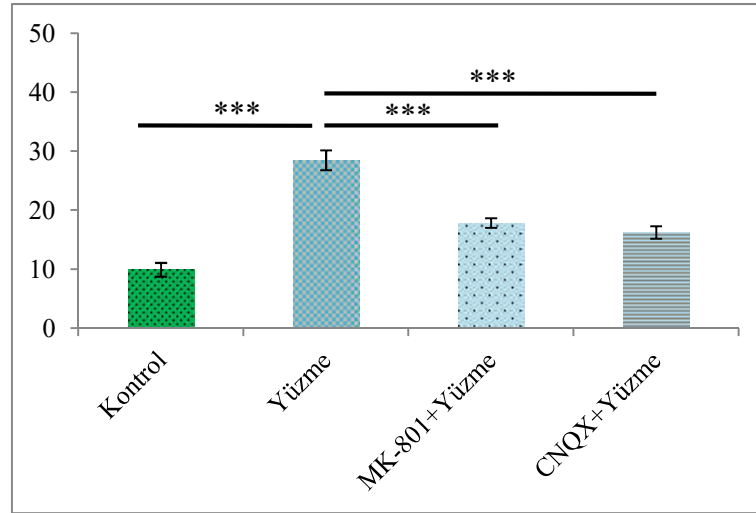
Şekil 26. Yüzme stresi ve glutamate reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).



Şekil 27. Yüzme stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %6,79±1,42, Yüzme stresi grubu %30,98±1,95, MK-801+Yüzme stresi grubu %18,72±1,40, CNQX+Yüzme stresi grubu %20,54±2,03.



Şekil 28. Yüzme stresi ve glutamate reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).

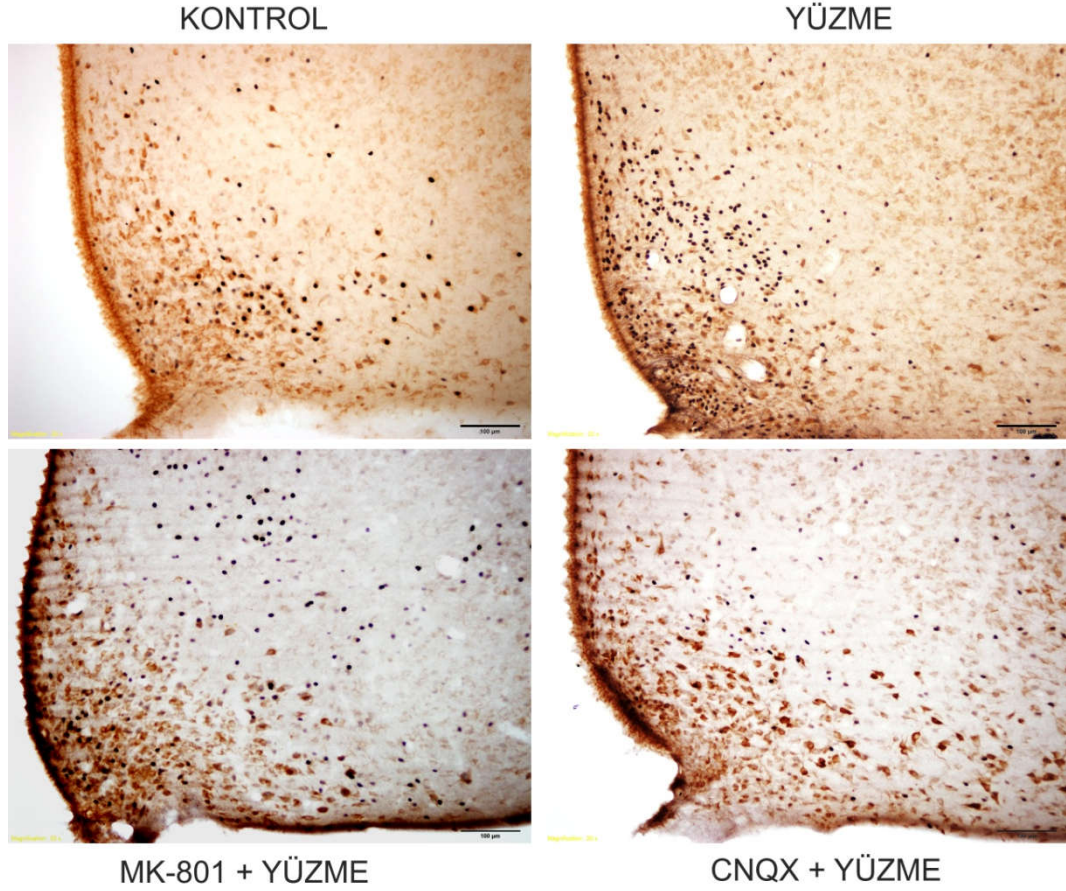


Şekil 29. Yüzme stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin paraventriküler nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %9,90±1,17, Yüzme stresi grubu %28,47±1,67, MK-801+Yüzme stresi grubu %17,82±0,81, CNQX+Yüzme stresi grubu %16,23±1,05.

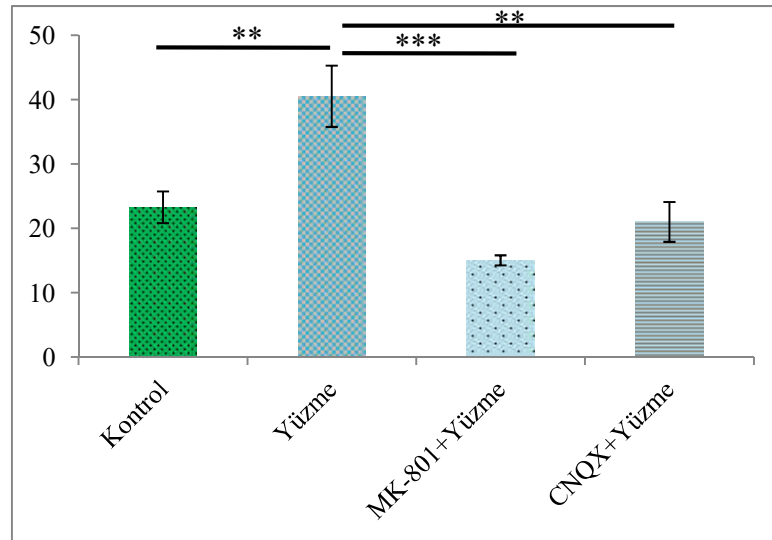
4.3.2.2. Yüzme Stresinin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Arkuat Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

Zorla yüzdürme stresi uygulamasının dişi sıçanlarda ARC'daki nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyona etkisinin ve bu aktivasyondaki glutamat reseptörlerinin rolünün ortaya konması amacıyla yapılan hücre sayımlarında; dişi sıçanlarda ARC'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %23,28, yüzme stresi grubunda %40,52, MK-801+yüzme grubunda %15,04, CNQX+yüzme grubunda %21 olarak bulunmuştur (Şekil 30). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu deney hayvanları ile kıyaslandığında yüzme stresi uygulamasının dişi sıçanların ARC'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı ($p=0,007$) ayrıca yüzme stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın tekrar kontrol grubuna benzer şekilde MK-801 ($p=0,001$) ve CNQX ($p=0,004$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 31).

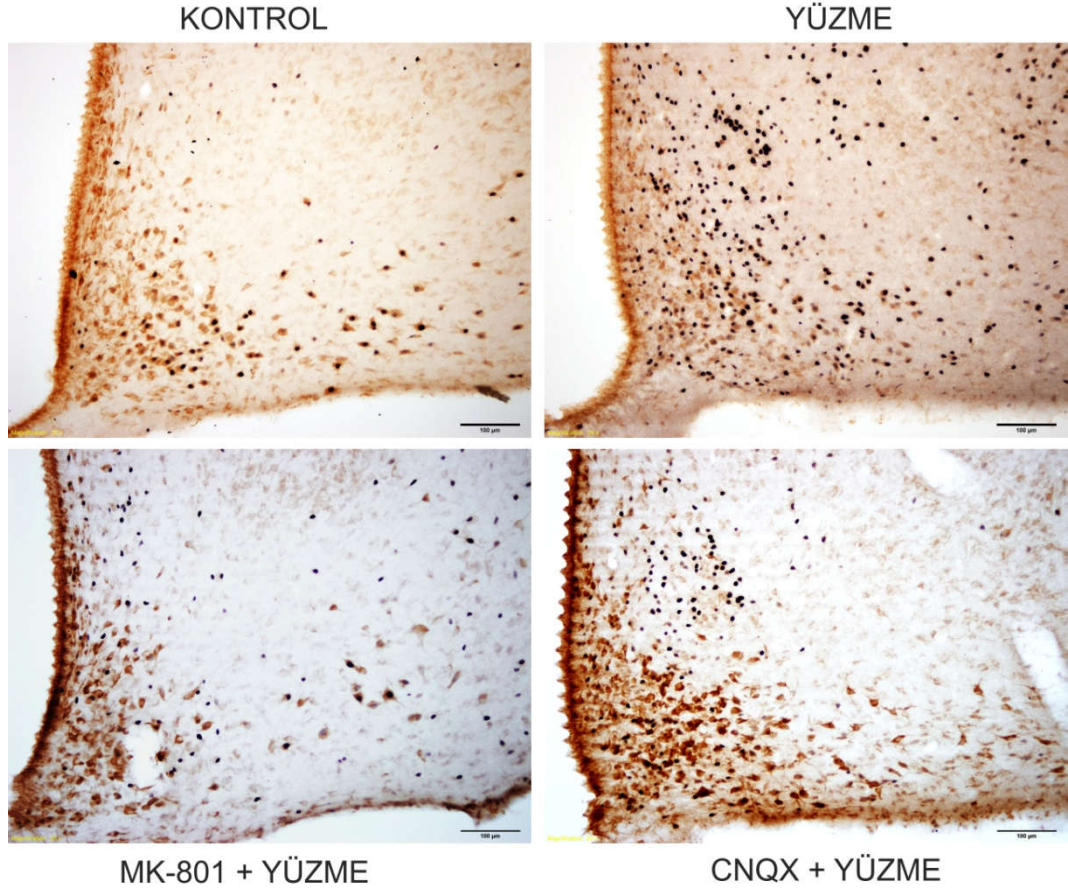
Erkek sıçanlarda ise; ARC'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %22,9, yüzme stresi grubunda %37,94, MK-801 ve yüzme stresi uygulanan grupta %14,15, CNQX+yüzme grubunda %20,77 olarak bulunmuştur (Şekil 32). İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda; kontrol grubu deney hayvanları ile kıyaslandığında yüzme stresi uygulamasının erkek sıçanların ARC'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı ($p=0,002$) ayrıca yüzme stresi ve antagonist grupları karşılaştırıldığında ise bu artışın tekrar kontrol grubuna benzer şekilde MK-801 ($p=0,001$) ve CNQX ($p=0,001$) gruplarında anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 33).



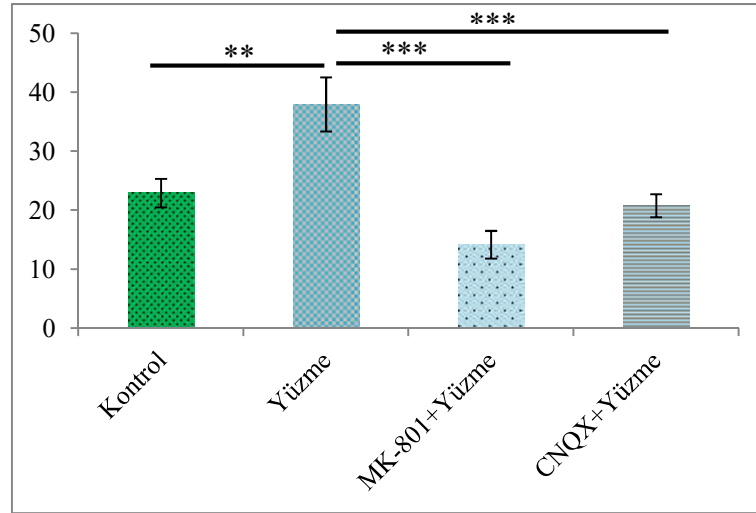
Şekil 30. Yüzme stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin arkuat nükleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).



Şekil 31. Yüzme stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin arkuat nükleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %23,28±2,46, Yüzme stresi grubu %40,52±4,76, MK-801+Yüzme stresi grubu %15,08±0,78, CNQX+Yüzme stresi grubu %21,00±3,09.



Şekil 32. Yüzme stresi ve glutamate reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin arkuat nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).

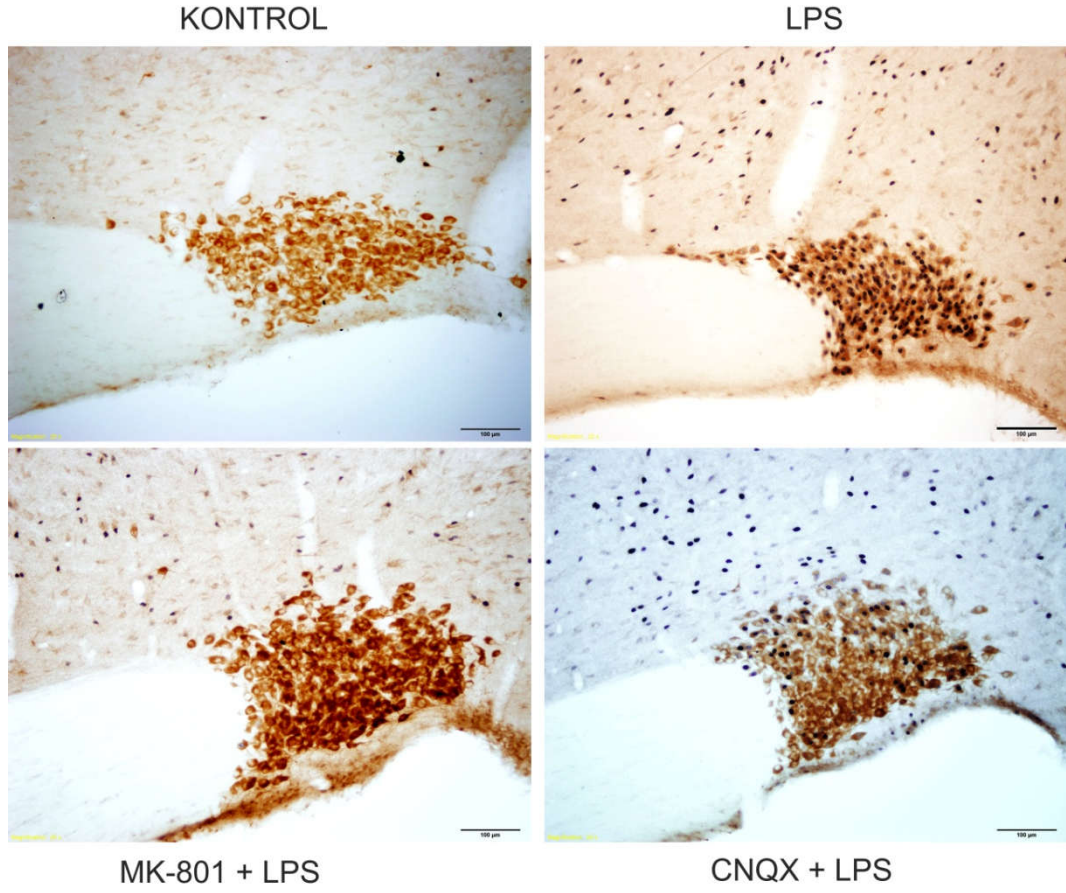


Şekil 33. Yüzme stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin arkuat nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %22,90±2,42, Yüzme stresi grubu %37,94±4,60, MK-801+Yüzme stresi grubu %14,15±2,34, CNQX+Yüzme stresi grubu %20,77±1,96.

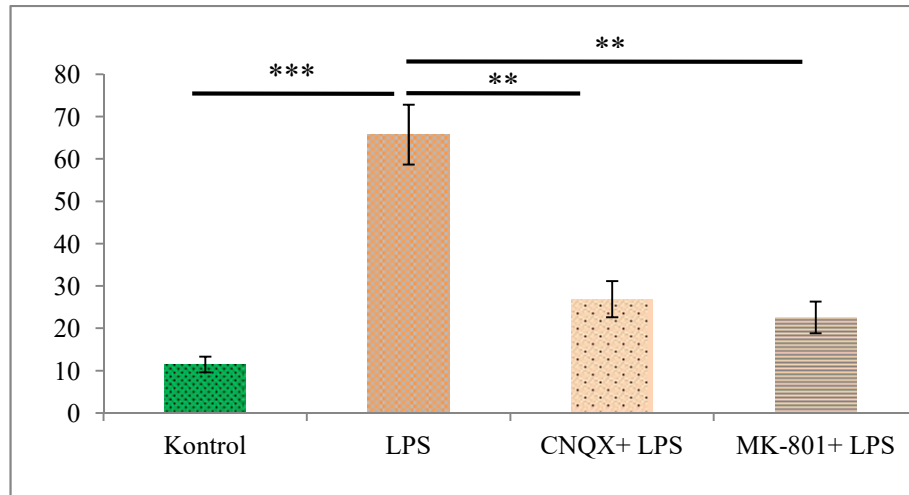
4.3.3. Akut Enflamatuvar Stresin ve Glutamat Reseptör Antagonistlerinin (MK-801 ve CNQX) Dişi ve Erkek Sıçanların Supraoptik Nukleusundaki Nesfatin-1 Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

Akut enflamatuvar stres uygulamasının dişi sıçanlarda SON'daki nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyona etkisinin ve bu aktivasyondaki glutamat reseptörlerinin rolünün ortaya konması amacıyla yapılan hücre sayımlarında; dişi sıçanlarda SON'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %11,49, LPS grubunda %65,79, MK-801+LPS grubunda %22,60, CNQX+LPS grubunda %26,93 olarak bulunmuştur (Şekil 34). Gruplar karşılaştırıldığında LPS stresinin dişi sıçanlarda SON'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı ($p=0,001$); MK-801 ($p=0,004$) ve CNQX ($p=0,007$) uygulamalarının ise LPS'in gerçekleştirdiğı aktivasyonu kontrol grubuna benzer şekilde tekrar anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Şekil 35).

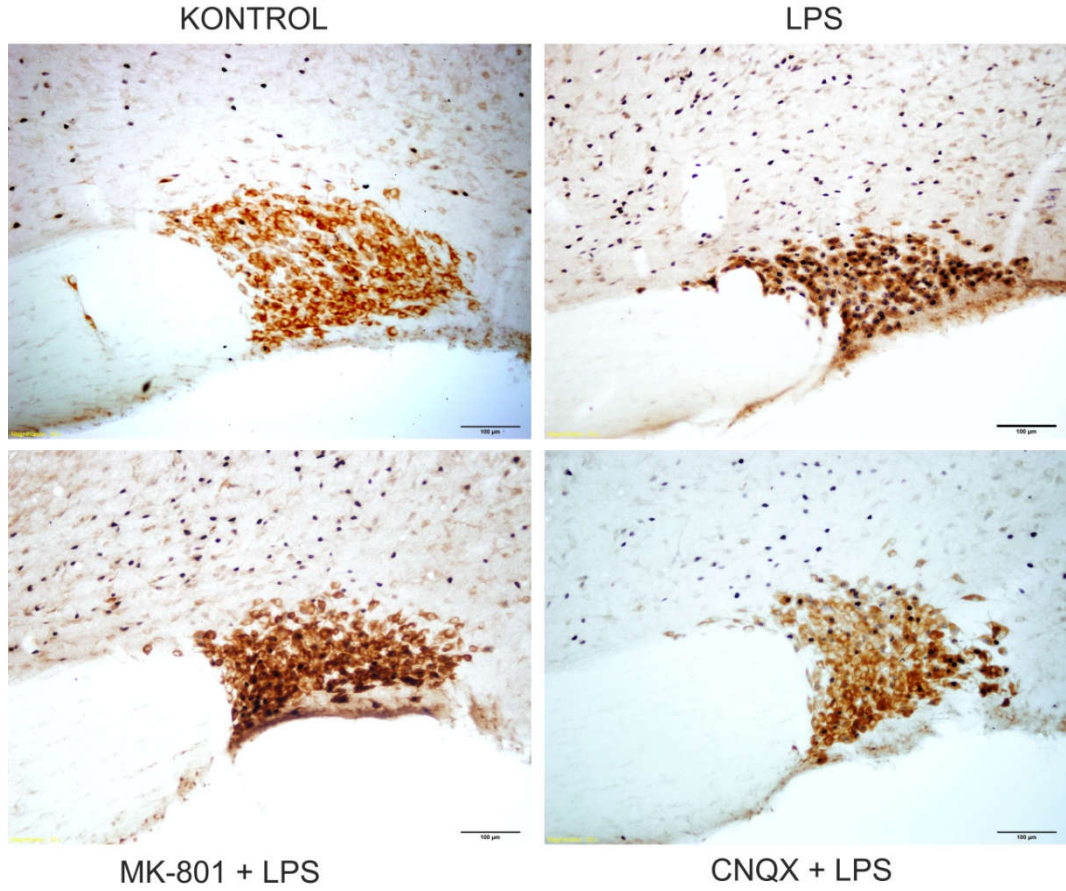
Erkek sıçanlarda ise; SON'da c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının yüzdesi kontrol grubunda %11,18, LPS grubunda %53,74, MK-801+LPS grubunda %23,46, CNQX+LPS grubunda %19,6 olarak bulunmuştur (Şekil 36). Gruplar karşılaştırıldığında LPS stresinin erkek sıçanlarda SON'da nesfatin-1 nöronu aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı ($p=0,001$); MK-801 ($p=0,002$) ve CNQX ($p=0,001$) uygulamalarının ise LPS'in gerçekleştirdiğı aktivasyonu kontrol grubuna benzer şekilde tekrar anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Şekil 37).



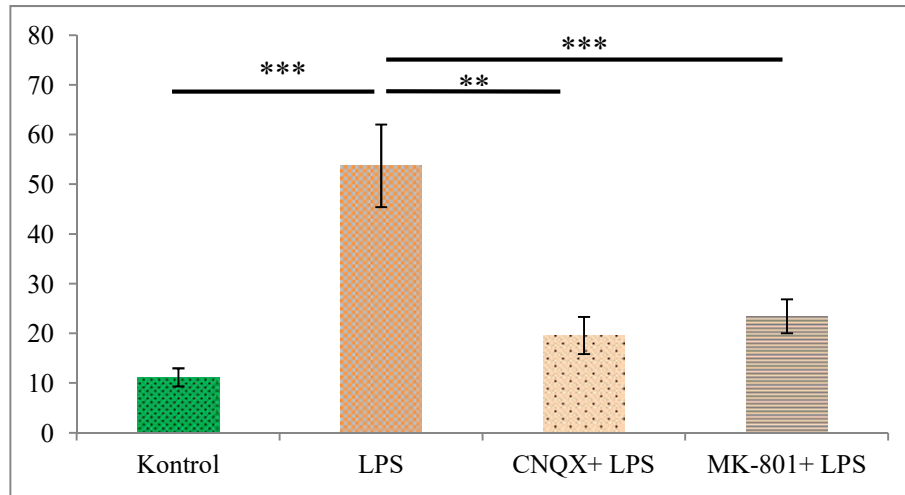
Şekil 34. LPS stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin supraoptik nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).



Şekil 35. LPS stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan dişi deneklerin supraoptik nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %11,49±1,85, LPS grubu %65,79±7,06, MK-801+LPS grubu %22,60±3,76, CNQX+LPS grubu %26,93±4,28.

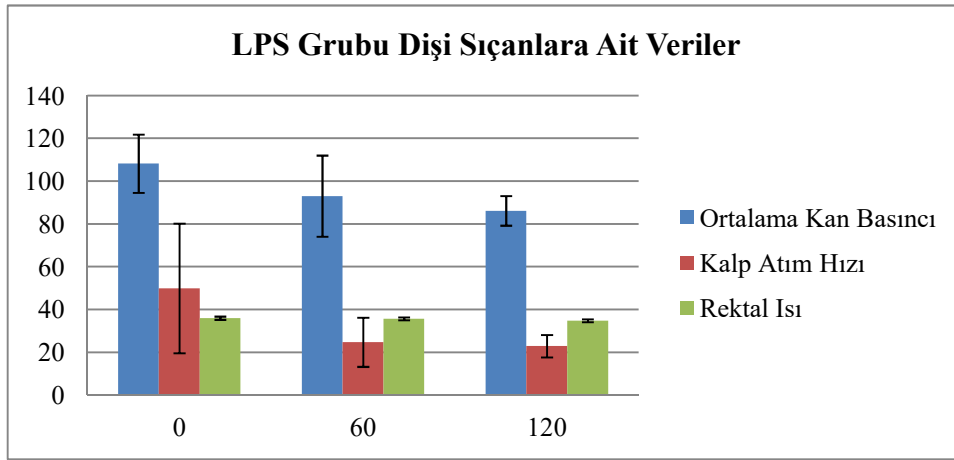


Şekil 36. LPS stresi ve glutamate reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin supraoptik nukleuslarında lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu (200X).

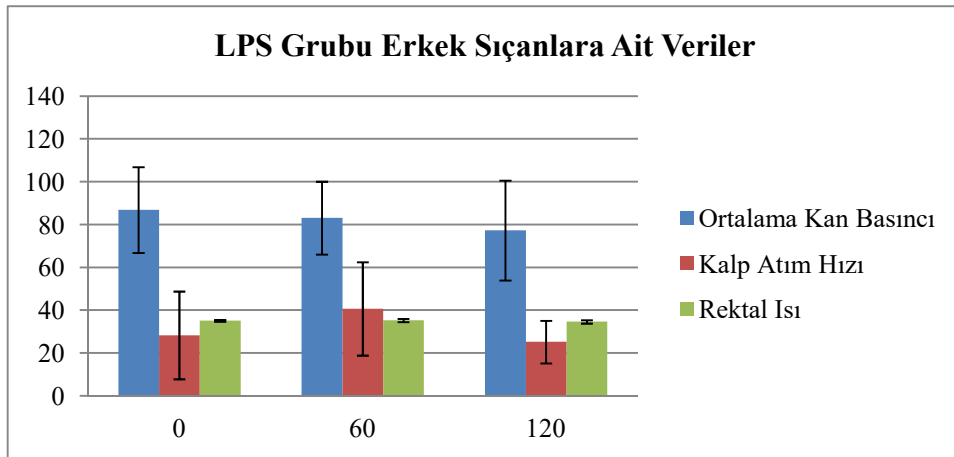


Şekil 37. LPS stresi ve glutamat reseptör antagonistlerinin enjeksiyonu sonrası stres uygulanan erkek deneklerin supraoptik nukleuslarında lokalize c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronları yüzdesi karşılaştırması. Kontrol grubu %11,18±1,82, LPS grubu %53,74±8,30, MK-801+LPS grubu %23,46±3,41, CNQX+LPS grubu %19,60±3,75.

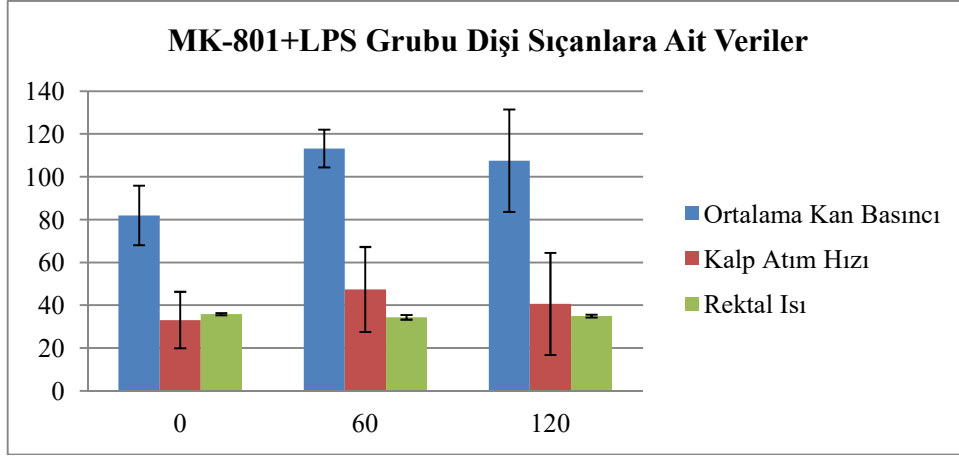
Akut enflamasyonun doğrulanması amacıyla yapılan LPS ve antagonist+LPS gruplarındaki dişi ve erkek deneklere ait kan basıncı ve rektal ısı değerleri Şekil 38-43’de gösterilmiştir. Sonuç olarak yalnızca LPS uygulanan dişi ve erkek sıçanların kan basıncı değerleri zamana bağlı olarak azalma göstermiş, antagonist uygulamalarında ise kararlı bir eğilim yerine zamana bağlı olarak dalgalanma göstermiştir. Aslında kan basıncı, kalp atım hızı ve rektal ısı değerlerinin zaman içerisinde değişim göstermiş olması akut enflamatuvar stresin gösterilmesi açısından yeterli görülmektedir.



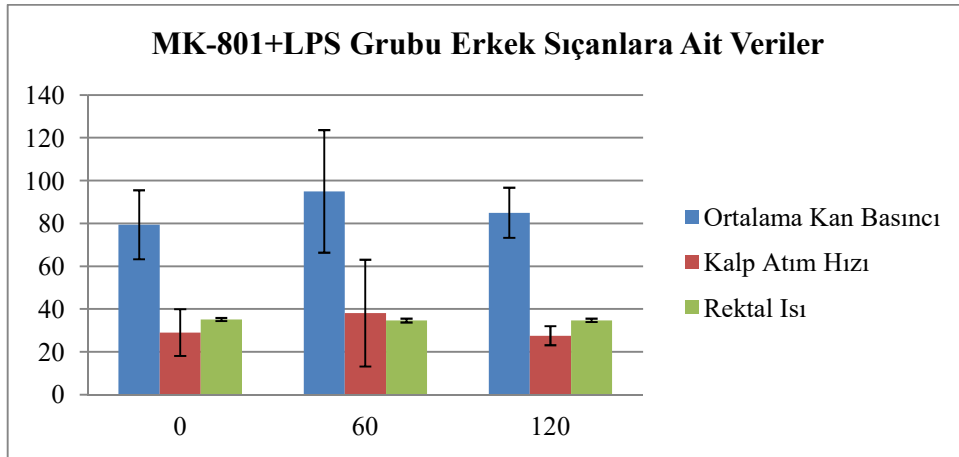
Şekil 38. LPS grubu dişi deney hayvanlarına ait 0, 60 ve 120. dk’larda ölçülen kan basıncı ve rektal ısı değişimini gösteren grafik.



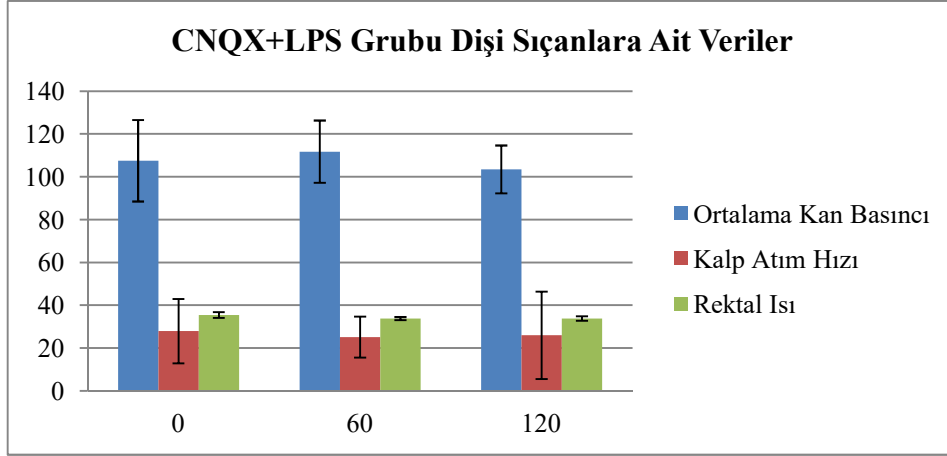
Şekil 39. LPS grubu erkek deney hayvanlarına ait 0, 60 ve 120. dk’larda ölçülen kan basıncı ve rektal ısı değişimini gösteren grafik.



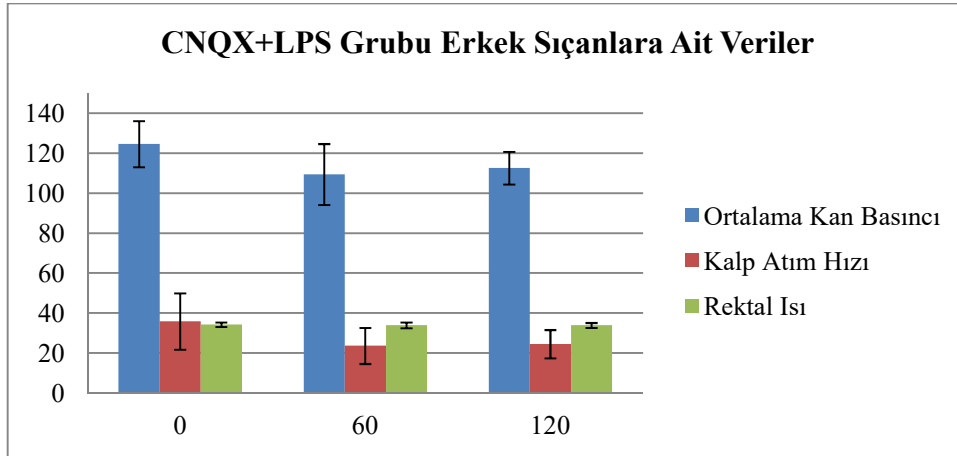
Şekil 40. MK-801 ve LPS uygulanan grubun dişi deney hayvanlarına ait MK-801 öncesi 0, 60 ve 120. dk'larda ölçülen kan basıncı ve rektal ısı değişimini gösteren grafik.



Şekil 41. MK-801 ve LPS uygulanan grubun erkek deney hayvanlarına ait MK-801 öncesi 0, 60 ve 120. dk'larda ölçülen kan basıncı ve rektal ısı değişimini gösteren grafik.



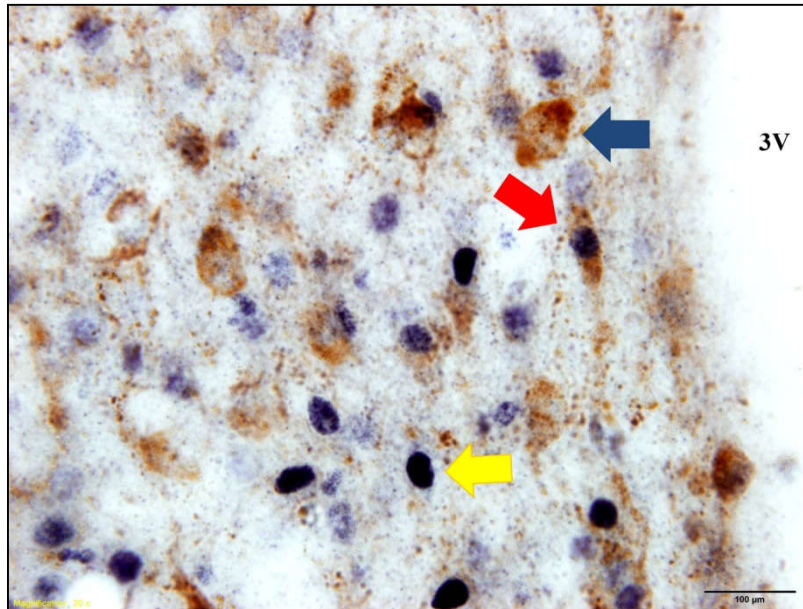
Şekil 42. CNQX ve LPS uygulanan grubun dişi deney hayvanlarına ait CNQX öncesi 0, 60 ve 120. dk'larda ölçülen kan basıncı ve rektal ısı değişimini gösteren grafik



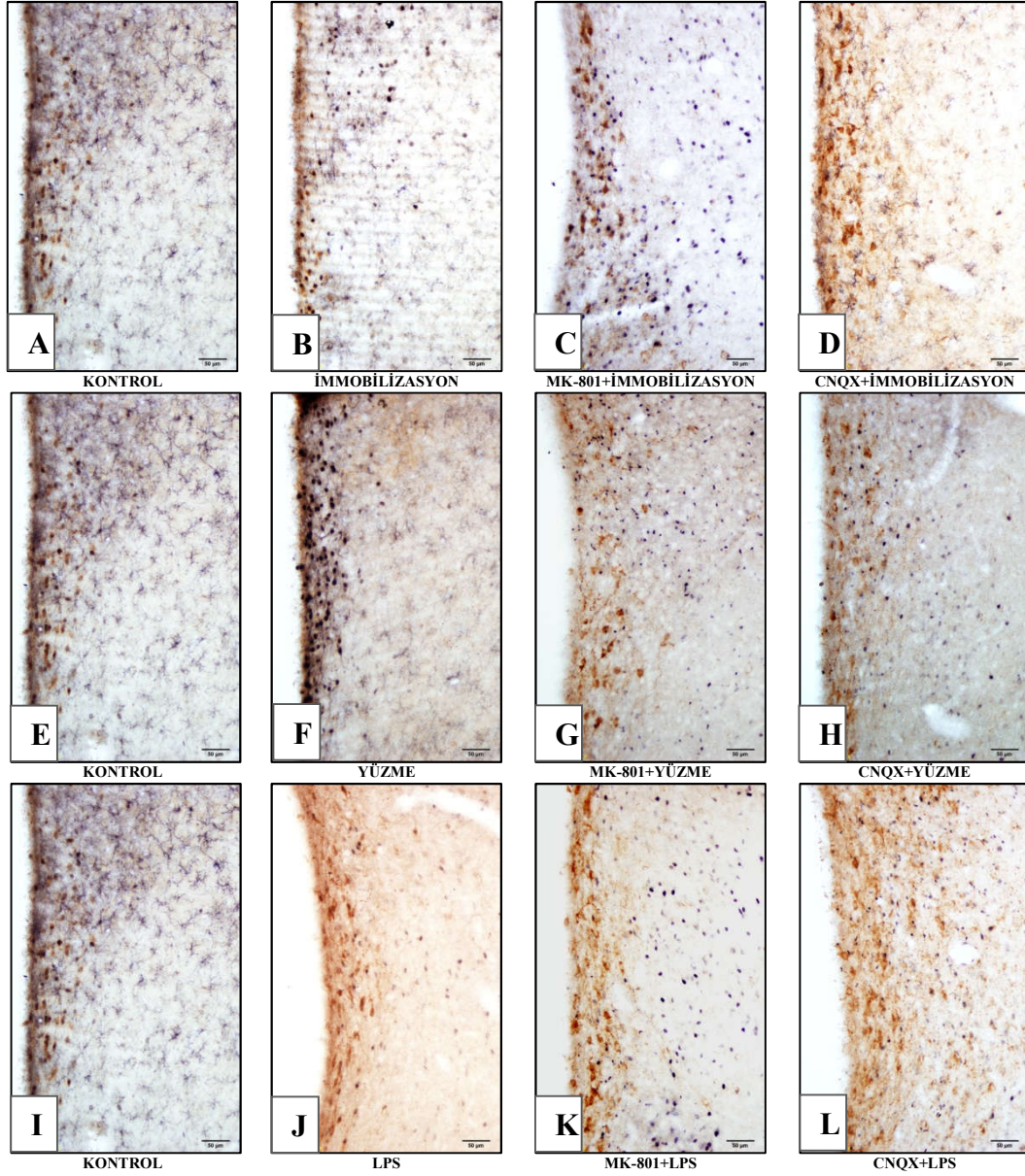
Şekil 43. CNQX ve LPS uygulanan grubun erkek deney hayvanlarına ait CNQX öncesi 0, 60 ve 120. dk'larda ölçülen kan basıncı ve rektal ısı değişimini gösteren grafik.

4.4. Stresin Nöronostatin Nöronları Aktivasyonuna Etkisinin Değerlendirilmesi

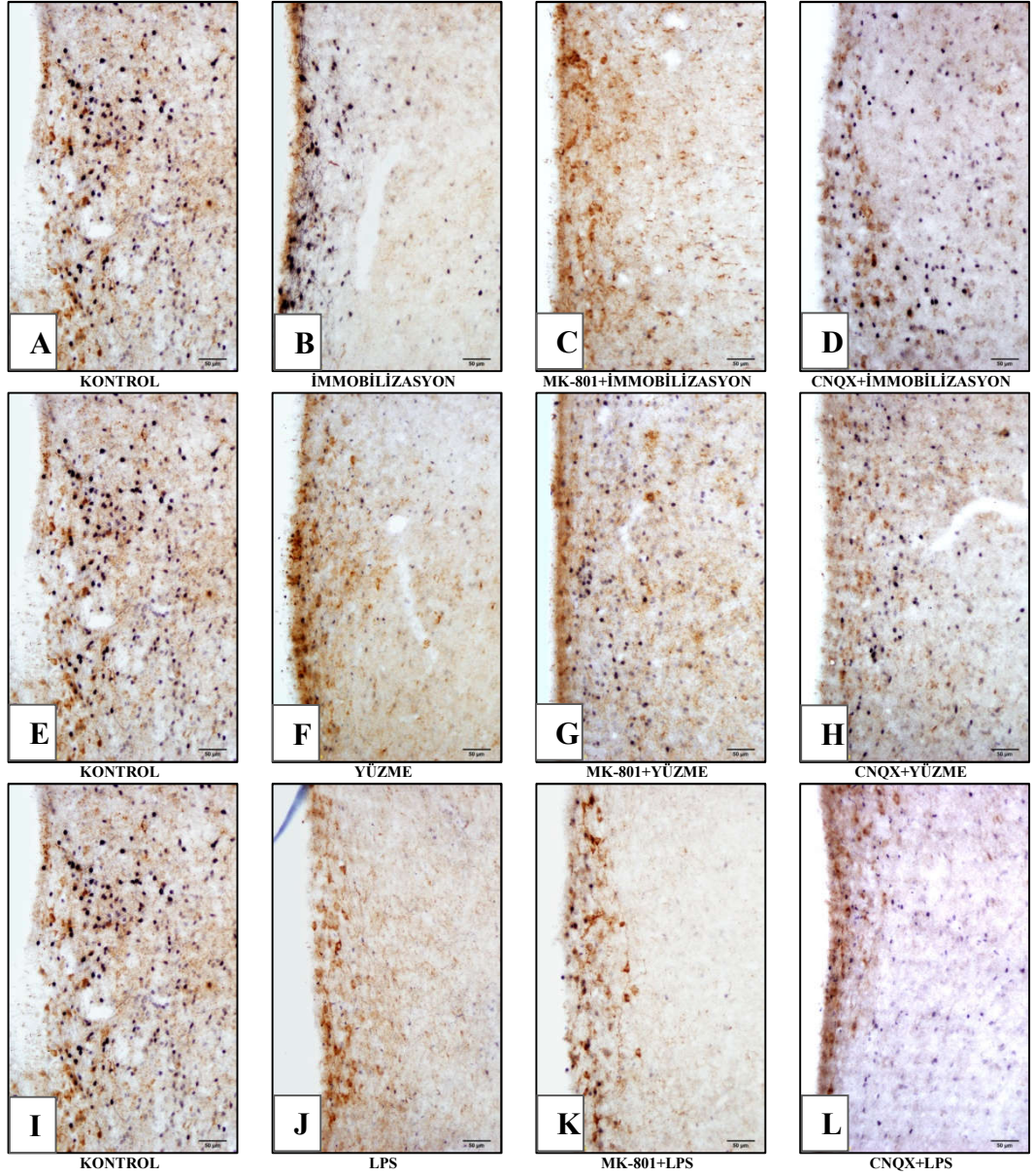
İmmobilizasyon, yüzme ve akut enflamatuvar LPS stresi uygulamalarının ve glutamat reseptör antagonistlerinin nöronostatin nöronlarının pSTAT5 üzerinden aktivasyonunun (Şekil 44) değerlendirildiği çalışmalar sonucu elde edilen hücre sayımlarında, nöronostatin nöronlarının stres etkenlerine bağlı olarak azalma ya da artma şeklinde değişimler gösterdiği fakat stres kontrol grubunun da dahil olduğu değerlendirmeler sonucunda stres oluşumunun nesfatin-1 nöronları sonuçları ile doğrulandığı deney hayvanlarında pSTAT5/nöronostatin ikili immünohistokimyasal sonuçlarının aynı grup içerisinde bile tutarlılık göstermediği bazı deney hayvanlarında hiç ko-ekspresyon görülmediği belirlenmiştir (Şekil 45 ve Şekil 46). Bu sonuçlar periferik stres sinyallerini nöronostatin nöronlarının yalnızca GR ile ko-ekspresyon göstermesi de göz önüne alındığında normal olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle pSTAT5/nöronostatin ikili işaretlemesine ait hücre sayımları Tablo 4’de verilmiştir. Gruplar arasında normalizasyon değerlendirildiğinde normal olmayan sonuçların ikili karşılaştırmaları yapılmamıştır.



Şekil 44: Stres gruplarında nöronostatin/PSTAT5 ikili immünohistokimyasal işaretlemeleri. PSTAT5 pozitif nöron çekirdekleri siyah renkli (sarı ok) ve nöronostatin pozitif hücre sitoplazmaları kahverengi renkli (mavi ok) olarak görülmektedir. PSTAT5 ekspresyon eden nöronostatin nöronları yani aktive olmuş nöronostatin nöronları kırmızı ok ile gösterilmiştir.



Şekil 45. Stres kontrol ve stres deney grupları dişi deney hayvanlarında periventriküler nukleusta PSTAT5 pozitif nöronostatin nöronları karşılaştırması. Stres kontrol grubu A, E ve I panellerinde, immobilizasyon grubu B panelinde, MK-801 ve immobilizasyon grubu C panelinde, CNQX ve immobilizasyon grubu D panelinde; yüzme grubu F panelinde, MK-801 ve yüzme grubu G panelinde, CNQX ve yüzme grubu H panelinde; LPS grubu J panelinde, MK-801 ve LPS grubu K panelinde, CNQX ve LPS grubu L panelinde gösterilmiştir (200X).



Şekil 46. Stres kontrol ve stres deney grupları erkek deney hayvanlarında periventriküler nukleusta PSTAT5 pozitif nöronostatin nöronları karşılaştırması. Stres kontrol grubu A, E ve I panellerinde, immobilizasyon grubu B panelinde, MK-801 ve immobilizasyon grubu C panelinde, CNQX ve immobilizasyon grubu D panelinde; yüzme grubu F panelinde, MK-801 ve yüzme grubu G panelinde, CNQX ve yüzme grubu H panelinde; LPS grubu J panelinde, MK-801 ve LPS grubu K panelinde, CNQX ve LPS grubu L panelinde gösterilmiştir (200X).

Yukarıda sonuçları verilen hücresel işaretlemelere ait istatistiksel değerlendirmelerde kullanılan hücre sayımları verileri aşağıdaki Tablo 5-10’da verilmiştir.

Tablo 4. Stres deney gruplarında PSTAT5 eksprese eden nöronostatin nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nöronostatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	pSTAT5 Eksprese Eden Nöronostatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	pSTAT5 Eksprese Eden Nöronostatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Stres Kontrol	Dişi	PeN	73,66±51,47	37,66±29,48	%49,34±6,79
	Erkek	PeN	333,00±326,68	40,66±41,34	%11,62±2,68
İmmobilizasyon	Dişi	PeN	180,00±56,35	52,66±32,06	%27,87±11,79
	Erkek	PeN	32,00±33,34	8,66±10,87	%20,93±9,82
MK-801 + İmmobilizasyon	Dişi	PeN	381,33±32,01	50,33±68,35	%12,08±19,98
	Erkek	PeN	273,66±35,26	1,00±0,81	%0,35±0,26
CNQX + İmmobilizasyon	Dişi	PeN	262,33±120,51	16,33±10,65	%7,59±5,40
	Erkek	PeN	261,33±147,54	14,66±20,03	%3,32±4,16
Yüzme Stresi	Dişi	PeN	71,66±30,26	3,66±3,29	%6,98±7,14
	Erkek	PeN	152,33±94,46	10,00±6,68	%8,20±3,79
MK-801 + Yüzme Stresi	Dişi	PeN	309,33±86,97	4,00±2,94	%1,57±1,36
	Erkek	PeN	240,00±164,85	30,00±39,60	%7,08±7,92
CNQX + Yüzme Stresi	Dişi	PeN	177,00±77,31	19,00±12,02	%18,01±20,81
	Erkek	PeN	272,00±56,04	8,33±4,56	%2,88±0,91
LPS Stresi	Dişi	PeN	497,33±92,62	72,66±37,96	%16,23±11,84
	Erkek	PeN	352,66±95,45	41,66±55,42	%9,31±12,27
MK-801 + LPS Stresi	Dişi	PeN	294,00±62,80	13,66±19,32	%4,93±8,54
	Erkek	PeN	297,33±132,75	65,33±46,77	%16,92±12,40
CNQX + LPS Stresi	Dişi	PeN	327,33±127,122	40,66±48,60	%16,51±26,41
	Erkek	PeN	232,33±32,06	15,66±16,81	%7,99±9,18

Tablo 5. Kontrol grubunda GR eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma. PVN; Paraventriküler nukleus, ARC; Arkuat nukleus.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nesfatin -1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	GR Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	GR Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Kontrol	Dişi	PVN	1909,20±441,98	664,00±190,81	%33,31±2,19
		ARC	894,00±497,95	379,00±324,27	%38,43±4,75
	Erkek	PVN	1438,40±475,30	413,40±126,78	%29,24±1,59
		ARC	551,60±405,96	140,80±161,01	%21,90±3,55

Tablo 6. Kontrol grubunda GR eksprese eden nöronostatin nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma PeN; Periventriküler nukleus.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nöronostatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	GR Eksprese Eden Nöronostatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	GR Eksprese Eden Nöronostatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Kontrol	Dişi	PeN	513,00±106,65	205,00±80,71	%39,11±4,02
	Erkek	PeN	697,80±228,71	281,20±109,57	%39,92±3,03

Tablo 7. Stres kontrol grubunda c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nesfatin -1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Stres Kontrol	Dişi	PVN	1541,85±290,68	106,85±62,34	%6,79±1,42
		ARC	1171,71±675,85	260,00±172,27	%23,28±2,46
		SON	1280,14±330,03	142,71±62,51	%11,49±1,85
	Erkek	PVN	1642,00±397,50	159,71±51,71	%9,90±1,17
		ARC	925,00±509,48	192,85±93,17	%22,90±2,42
		SON	1695,57±338,79	198,00±105,91	%11,18±1,82

Tablo 8. İmmobilizasyon stresi ve antagonist gruplarında c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nesfatin -1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
İmmobilizasyon	Dişi	PVN	2648,71±863,05	846,85±354,38	%31,79±2,67
		ARC	1427,14±646,67	472,28±235,24	%35,26±4,63
	Erkek	PVN	2938,14±1413,15	957,14±567,24	%31,36±3,67
		ARC	1842,85±743,34	508,42±191,47	%27,91±1,71
MK-801 + İmmobilizasyon	Dişi	PVN	1220,71±455,97	209,28±87,57	%16,78±0,87
		ARC	1666,71±668,95	319,28±148,69	%19,13±1,89
	Erkek	PVN	1279,42±487,26	271,71±108,78	%21,06±1,29
		ARC	1562,28±681,55	285,85±170,03	%17,35±1,43
CNQX + İmmobilizasyon	Dişi	PVN	1830,57±481,42	352,28±67,09	%20,65±3,12
		ARC	1220,71±455,97	209,28±87,57	%16,19±2,40
	Erkek	PVN	1811,28±688,83	333,00±127,36	%18,72±1,65
		ARC	1152,42±622,73	398,71±349,92	%15,02±1,90

Tablo 9. Yüzme stresi ve antagonist gruplarında c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nesfatin -1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
Yüzme Stresi	Dişi	PVN	1197,00±442,37	384,57±188,58	%30,98±1,95
		ARC	1796,14±493,47	684,42±107,74	%40,52±4,76
	Erkek	PVN	1272,00±511,90	364,00±144,38	%28,47±1,67
		ARC	934,14±506,72	360,42±218,51	%37,94±4,60
MK-801 + Yüzme Stresi	Dişi	PVN	1209,00±230,64	230,14±74,87	%18,72±1,40
		ARC	1826,57±674,58	269,85±90,93	%15,04±0,78
	Erkek	PVN	1934,57±776,82	336,71±118,67	%17,82±0,81
		ARC	1293,42±600,16	184,00±65,19	%14,15±2,34
CNQX + Yüzme Stresi	Dişi	PVN	2175,71±872,46	434,57±204,64	%20,54±2,03
		ARC	1978,42±706,57	381,71±149,43	%21,00±3,09
	Erkek	PVN	2542,85±664,99	419,42±161,35	%216,23±1,05
		ARC	1907,71±868,45	401,85±213,08	%20,77±1,96

Tablo 10. Akut enflamatuvar stres (LPS) ve antagonist gruplarında c-Fos eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının ortalama sayıları ve yüzdeleri±standart sapma.

Deney Grubu	Cinsiyet	Alan	Nesfatin -1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos Eksprese Eden Nesfatin-1 Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
LPS Stresi	Dişi	SON	1647,14±393,27	1107,85±436,91	%65,79±7,06
	Erkek	SON	1629,57±229,23	851,57±298,46	%53,74±8,30
MK-801 + LPS Stresi	Dişi	SON	1761,85±419,43	404,28±209,58	%22,60±3,76
	Erkek	SON	1782,85±509,39	441,42±206,82	%23,46±3,41
CNQX + LPS Stresi	Dişi	SON	2151,42±684,33	582,42±289,13	%26,93±4,28
	Erkek	SON	2370,28±474,39	454,42±237,97	%19,60±3,75

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tüm canlı organizmalar iç ve dış stres faktörlerinin etkisi altındadır ve bu etkilere karşı normal dengelerini korumaya çalışırlar. Strese adaptasyon ve homeostazisin korunmasında çeşitli nöroendokrin mekanizmalar rol oynarlar. Bu mekanizmaların aktive olmasında davranışsal, endokrin, immün ve otonom sinir sistemlerinin etkileri görülmektedir.

Stres yanıtında esas olarak aktive olan endokrin sistem hipotalamus, hipofiz ve adrenal bezi içeren bir negatif geri bildirim mekanizması olan HPA aksıdır (Aguilera, 2012). Stres uyarısının etkisiyle hipotalamik PVN’da yerleşik CRH nöronlarında sentezlenen nörohormon hipofiz portal dolaşımıyla kortikotropik hücrelere ulaşır ve bu hücrelerin ACTH salgılamasını uyarır ve bu hormon da adrenal korteksten glukokortikoidlerin salıverilmesini tetikler. Organizmanın strese karşı geliştirdiği metabolik ve davranışsal yanıtta hem CRH’nın (Dunn ve Berridge, 1990) hem de glukokortikoidlerin (Oitzl ve ark., 2010) rolü vardır. CRH nöron aksonlarının önemli bir bölümü median eminense sonlanırken diğer bir bölümü bazı hipotalamik çekirdekleri, limbik yapıları ve beyin sapını inerve etmektedir (Swanson ve ark., 1983; Sakanaka ve ark., 1987; Potter ve ark., 1994). İkinci grupta yer alan nöronların strese karşı geliştirilen davranışsal ve fizyolojik yanıtın merkezi düzenlenmesinde CRH’u nörotransmitter olarak kullandıkları düşünülmektedir (Aguilera, 2012). CRH etkilerini CRFR-1 ve CRFR-2 adındaki reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. Bu reseptörler kortikotropinlerin yanı sıra merkezi sinir sisteminde, hipotalamus, limbik yapılar ve beyin sapını da içerecek şekilde, yaygın olarak eksprese edilmektedir (Bale ve Vale, 2004). Stres sinyallerinin CRH nöronlarına ulaşmasında glutamaterjik sistemin etkili olduğu bilinmektedir (Wamsteeker ve

Bains, 2010). Besin alımının baskılanmasında da CRH sinyal mekanizmasının yer aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Stengel ve Tache, 2014).

Organizmada stres yanıtını oluşturulmasında glukokortikoidlerin merkezi etkilerinin de önemi vardır. Genel dolaşımla merkezi sinir sistemine ulaşan glukokortikoidler özellikle HPA üzerinde negatif geri besleme etkisi gösterirler. Bu etkilerine GR ve MR reseptörleri aracılık eder. Bu reseptörlerin PVN dışında hipotalamusun diğer çekirdeklerinde, hipokampüste, amigdalada ve beyin sapında eksprese oldukları gösterilmiştir (Morimoto ve ark., 1996). Glukokortikoidlerin besin alımını düzenleyen merkezlerde ve nöronlarda etkili olarak organizmanın strese karşı davranışsal yanıtında oreksijenik ve anoreksijenik mekanizmalara katkı sağladığı rapor edilmiştir (Shishkina ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stres moleküllerini sentezleyip sentezlemediğinin araştırılması çalışmamızın birinci hipotezi olarak test edilmiştir. Sonuç olarak nesfatin-1 molekülünün protein düzeyinde CRFR-1, CRFR-2, GR ve MR ile ko-lokalize olarak bulunması nesfatin-1 molekülü aracılığıyla gerçekleşen besin alımında stresin etkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. CRFR-1, CRFR-2 ve MR proteinlerinin nesfatin-1 ile ko-lokalizasyonu bu moleküllerin sitoplazmik ekspresyonları nedeniyle immünofloresan yöntem ile değerlendirilmiştir. GR ise çekirdekte ekspresyon göstermektedir ve nesfatin-1 nöronları için dişi ve erkek deney hayvanları karşılaştırıldığında ARC'da GR eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının erkek deney hayvanlarından anlamlı olarak daha yüksek yüzdeye sahip olması dişi deney hayvanlarının erkek deney hayvanlarına göre stresten daha fazla etkilenebileceği şeklinde speküle edilebilir. Fakat bu hipotezin doğruluğunun saptanması için daha fazla denek ile değerlendirilmesi uygundur şeklinde düşünülmüştür.

Nöronostatin nöronları incelendiğinde ise, GR molekülünün protein düzeyinde nöronostatin ile %39 gibi bir oranda dişi ve erkek deney hayvanlarında ko-lokalize olarak bulunduğu saptanmış fakat nöronostatin nöronlarının protein düzeyinde CRFR-1, CRFR-2 ve MR eksprese etmedikleri görülmüştür. Bu durum aslında nöronostatin nöronlarının stresten nesfatin-1 nöronları kadar etkilenmediği

şeklinde speküle edilebilir fakat çalışmanın diğer hipotezlerinin test edilmesi sırasında nöronostatinin stres deney gruplarında gruplar ve aynı gruptaki hayvanlar bakımından tutarlılık göstermemesi nedeniyle hem nöronostatin ile yapılan ikili immünohistokimyasal ve immünfloresan değerlendirmelerin tekrarlanması hem de nöronostatin mRNA düzeylerinin de incelenerek ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği şeklinde yorumlanmıştır.

Sonuç olarak nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının stres moleküllerini protein düzeyinde sentezleyip sentezlemediği, CRFR-1, CRFR-2, glukokortikoid ve mineralokortikoid reseptörler (GR ve MR) ile ikili immünohistokimyasal ve immünfloresan işaretlemeler yapılarak araştırılmıştır. Çalışmada, özellikle nesfatin-1 nöronlarının merkezi ve periferik stres sinyallerini algılayacak inervasyon ve reseptörlere sahip olduğu belirlenirken, nöronostatin nöronları için daha fazla veriye ihtiyaç duyulduğu düşünülmüştür.

Hipotalamus, iştahın kontrol edilmesi ve enerji homeostazisinin düzenlenmesi işlevlerinin kontrol edildiği çok önemli bir merkezi sinir sistemi alanıdır. Hipotalamusta yer alan çok sayıda nörohormon, nöropeptit ve nörotransmitter sistemleri besin alımının koordinasyonunda bu peptitler aracılığı ile etki gösterirler. Son yıllarda endojen bir protein olarak tanımlanan nesfatin-1 ilk kez hipotalamusta ve soliter traktusta (Oh-I ve ark., 2006) tokluğu indükleyen bir molekül olarak keşfedilmiş, vücuda besin alımını güçlü bir şekilde engellediği gösterilmiştir (Pałasz ve ark., 2012; Shimizu ve ark., 2009; Stengel ve ark., 2010a, 2010b).

Merkezi sinir sisteminin ana eksitator sinyal yolağı olan glutamaterjik sistemin hipotalamik nöro-endokrin sistemler üzerindeki etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır. Glutamat beyindeki ana eksitator nörotransmitter olmasına rağmen adrenal bez, hipofiz, epifiz, pankreatik adacıklar, retina, karaciğer, böbrek, bağırsaklar, kalp, akciğer ve iskelet kası gibi birçok periferik dokuda da bulunmaktadır (Hu ve ark., 2004). Hem hayvanlarda hem de insanlarda NMDA reseptör antagonistlerinin anksiyolitik ve antidepresan etkileri de olabileceği bildirilmiştir (Chang ve ark., 2015; Ghasemi ve ark., 2014). NMDA glutamat reseptörlerinin, genç yetişkin farelerde sosyal yenilgi stresinin kısa vadeli

etkilerinde önemli bir rol oynadığı ayrıca NMDA antagonisti uygulamalarının, sosyal yenilginin negatif etkilerini tersine çevirmede etkili olurken AMPA antagonisti CNQX'in negatif etkileri değiştirmedeği bildirilmiştir (García-Pardo ve ark., 2018). Bu sonuçlar ile çelişen diğer çalışmalarda ise antagonist uygulamalarında deneğin yaşının, uygulanan antagonisten dozunun ve tipinin antagonist etkilerini değiştirebileceğini öne sürmüşlerdir (Caldwell ve Riccio, 2010; Miczek ve ark., 2008; Garcia-Pardo ve ark., 2017). NMDA reseptörlerinin ayrıca psikiyatrik bozuklukların patofizyolojisine nörotransmisyonuna aracılık ettiği bildirilmiştir (Hashimoto ve ark., 2013; Marek ve ark., 2010; Merritt ve ark., 2013). Bununla birlikte, kemirgenlerde MK-801'in 0,1 mg/kg dozda, farelerde zorunlu yüzme testi (FST) sırasında hareketsizlik süresini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca MK-801'in, tek bir dozun uygulanmasından sonra 3 saat boyunca devam eden kısa bir yarı ömre sahip olduğu gösterilmiştir (Autry ve ark., 2011). NMDA reseptörleri ağırlıklı olarak uyarıcı sinapslar olarak tanımlanmakta ve merkezi sinir sisteminde (Li ve ark., 2010) her yerde bulundukları bildirilmiştir. Özellikle depresyon tedavisinde bu reseptörler, ilaç geliştirme hedefleri haline geldiği bilinmektedir (Li ve ark., 2010; Miller ve ark., 2014). NMDA reseptör antagonisti olan ketaminin, tedaviye dirençli depresyon için en ilgi çekici antidepresanlardan biri olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Krystal ve ark., 2013; Lodge ve Mercier, 2015). Farklı çalışmalarda da MK-801'in hızlı bir antidepresan etkisine sahip olduğunu göstermiştir (Yang ve ark., 2016; Zanos ve ark., 2016).

c-Fos proteini akut nöronal aktivasyon belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Erkek Sprague Dawley tipi sıçanlara immobilizasyon stresi uygulanan bir çalışmada c-Fos pozitif nesfatin-1 nöronlarının sayısının PVN, SON, NTS, LC, dorsal raphe pallidus (DR)'de arttığı fakat kan plazma düzeyinde nesfatin-1 seviyesinde bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (Yoshida ve ark., 2010). Yine immobilizasyon stresi uygulanmış erkek sıçanlarda c-Fos pozitif nesfatin-1 immünoreaktif hücrelerin sayısı PVN'in medial parvoselüler hücrelerinde artış gösterirken, nesfatin-1 mRNA ekspresyonunun, PVN ve VLM'de önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Könczöl ve ark., 2010).

Non-pregangliyonik Edinger-Westphal nukleus (npEW) stres düzenlenmesinde rol almakta ve yüksek oranda nesfatin-1 ekprese eden nöron barındırmaktadır. Akut immobilizasyon stresi npEW’da erkek farelerde NUCB2/nesfatin-1 mRNA seviyelerini ve c-Fos immünoaktivitesi artmaktadır (Okere ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise NUCB2/nesfatin-1 mRNA seviyelerinin immobilizasyon stresi sonrası değişmediği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2015). Zıt olarak başka bir çalışma ise immobilizasyon stresinin plazma nesfatin-1 seviyelerinde değişikliğe yol açmadığı bildirilmiştir (Yoshida ve ark., 2010).

Bizim çalışmamızda da immobilizasyon stresinin dişi ve erkek deney hayvanlarının PVN ve ARC’da kontrol grubu ile kıyaslandığında nesfatin-1 aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan i.p. NMDA reseptör antagonisti MK-801 ve non-NMDA reseptör antagonisti CNQX enjeksiyonları sonrası immobilizasyon stresi uygulandığında ise nesfatin-1 aktivasyonunun her iki antagonist uygulamasında da kontrol grubuna yakın bir şekilde tekrar azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak; psikolojik bir akut stres modeli olarak deney hayvanlarında kullanılan immobilizasyon stresinin nesfatin-1 nöronları aracılığıyla besin alımını azaltabileceği ve besin alımının bu şekilde azalmasının da glutamaterjik sistem aracılığıyla gerçekleşiyor olabileceği düşünülmüştür.

Akut stres modeli olan sudan kaçınma stresi uygulanan erkek farelerde sıçanlarda nesfatin-1 nöronlarında Fos ekspresyonunun PVN, EW, LC, rostral raphe pallidus (rRPa), VLM ve NTS’da arttığı bildirilmiştir (Stengel ve ark., 2011). Yine sudan kaçınma stresi uygulanan erkek sıçanlarda plazma nesfatin-1 seviyeleri ve hipotalamik nesfatin-1 mRNA seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Yin ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda ise immobilizasyon stresi gibi plastik silindirik şeklindeki yüzme tankında dişi ve erkek Sprague dawley tipi sıçanlara zorla yüzdürme stresi uygulanmıştır. Belirlenen 20 dk’lık yüzme stresi uygulama süresi hem c-Fos pozitif hücrelerin en yüksek sayıda olduğu süre hem de NMDA antagonisti olan MK-801 enjeksiyonu sonrası deney hayvanlarının yüzmeye en

çok dayanabildikleri süre olarak çalışmamızda belirlenmiştir. Çalışmada yüzmeye stresini sonrası, immobilizasyon stresinde olduğu gibi dişi ve erkek deney hayvanlarının PVN ve ARC'da kontrol grubu ile kıyaslandığında nesfatin-1 aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan i.p. NMDA reseptör antagonisti MK-801 ve non-NMDA reseptör antagonisti CNQX enjeksiyonları sonrası immobilizasyon stresini uygulandığında ise nesfatin-1 aktivasyonunun her iki antagonist uygulamasında da kontrol grubuna yakın bir şekilde tekrar azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak; hem psikolojik hem de fizyolojik bir akut stres modeli olarak deney hayvanlarında kullanılan yüzmeye stresinin nesfatin-1 nöronları aracılığıyla besin alımını azaltabileceği ve besin alımının bu şekilde azalmasının da glutamaterjik sistem aracılığıyla gerçekleşiyor olabileceği düşünülmüştür.

Abdominal cerrahi ve LPS uygulaması gibi fiziksel stres uygulamalarının nesfatin-1 nöronlarını aktive ettiği bildirilmiştir (Bonnet ve ark., 2009; Stengel ve ark., 2010b, 2011). Laparotomi ve çekal palpasyonu içeren abdominal cerrahinin erkek sıçanların SON, PVN, rRPa, LC, npEW, NTS ve VLM'da nesfatin-1 nöronlarında Fos ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Stengel ve ark., 2010b). İnflamasyon modeli ve immünolojik stresör olan LPS'in i.p. uygulamasının ciddi anlamda PVN, NST, SON ve ARC'da Wistar erkek sıçanlarda nesfatin-1 nöronlarını aktive ettiği bildirilmiştir (Bonnet ve ark., 2009). LPS uygulaması merkezi etkilerinin dışında plazma nesfatin-1 seviyelerini, gastrik NUCB2/ nesfatin-1 mRNA ve protein seviyelerini de arttırmaktadır (Bonnet ve ark., 2009).

Bizim çalışmamızda da akut enflamatuvar lipopolisakkarit stresinin dişi ve erkek deney hayvanlarının SON'da kontrol grubu ile kıyaslandığında nesfatin-1 aktivasyonunu anlamlı olarak arttırdığı gösterilmiştir. Diğer stres modellerinde PVN ve ARC hipotalamik alanlarında görülen bu aktivasyondan oldukça yüksek seviyede görülen LPS stresini sonrası nesfatin-1 aktivasyonu özellikle de SON gibi besin alımının düzenleniminde önemli olan bir alanda olması LPS stresinin besin alımını önemli ölçüde baskılayabileceği şeklinde yorumlanmıştır. LPS stresini

sonrası bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan NMDA reseptör antagonisti MK-801 ve non-NMDA reseptör antagonisti CNQX enjeksiyonları sonrası i.p. LPS enjeksiyonu ile yeniden akut enflamatuvar stresi oluşturulduğunda ise nesfatin-1 aktivasyonunun her iki antagonist uygulamasında da kontrol grubuna yakın bir şekilde tekrar azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak; fizyolojik bir akut stres modeli olarak uyguladığımız LPS stresinin deney hayvanlarında kullanılan besin alımını azaltabileceği ve besin alımının bu şekilde azalmasında da glutamaterjik sistemin önemli bir etkisi olduğu çalışmamızda gösterilmiştir.

Hipotalamusta nöronostatin immünoreaktivitesi başlıca aynı zamanda somatostatin immünoreaktif olan periventriküler nukleusta saptanmıştır (Dun ve ark., 2010). Bu alan aynı zamanda beyinde besin alımı düzenlenmesinde önemli olan bir alandır (Berthoud, 2002). Yetişkin erkek sıçanların lateral ventriküllerine i.c.v. nöronostatin enjekte edildiğinde, nöronostatinin hem gıda hem de su alımının inhibisyona yol açtığı ve bunun doz ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Samson ve ark., 2008). Nöronostatinin plazma seviyelerinin, beslenme durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği, gece boyunca hızla yükseldiği ve yeniden besleme durumundan sonra hızlıca başlangıç noktasına geri döndüğü gözlenmiştir (Elrick ve ark., 2015).

Çalışmamızda nöronostatinin hem dişi ve erkek denekler arasında, hem de antagonist etkilerinin incelenmesi amacıyla gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, aynı grup içerisinde bile deneklerin kendi aralarında korelasyon göstermediği saptanmış ve bu durumun sebebinin nöronostatinin hızlı etki göstermesinin farklı stres modelleri uygulanan sıçanlardaki ekspresyon farklılıklarının sebebi olabileceği düşünülmüştür. Nöronostatin c-Fos ve c-Jun gibi erken yanıt genlerini nöronal dokularda, ön hipofizde, gastrointestinal dokularda (Hua ve ark., 2009) ve kardiyomiyositlerde (Samson ve ark., 2008) uyardığı çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat bizim çalışmamızda aktivasyon belirteci olarak nesfatin-1 için c-Fos kullanılıp başarılı sonuç alınmasına rağmen, nöronostatin antikorunda pSTAT5 kullanılmıştır. pSTAT5 kullanımının sebebi daha önce yaptığımız denemelerde c-Fos belirtecinin daha az sayıda nöronostatin

nöronu ile ko-lokalize olarak tespit edilmesidir. Daha ileri çalışmalarda c-Fos belirteci ile daha fazla denek ile deneme yapmak ve daha sonra deneyi yorumlamak daha doğru bir yaklaşım olarak düşünülebilir.

Nöronostatin merkezi melanokortin sistemi yoluyla hem gıda hem de su alımının inhibe edilmesine yol açtığı bildirilmiştir (Yosten ve Samson, 2010). Yine nöronostatinin psikolojik duygu durum düzenlemesindeki olası araştırılmış ve nöronostatinin, zorla yüzdürme testinde farelerin depresyonla ilgili tepkilerinde artışa neden olduğu ve bu etkinin merkezi melanokortin sistemi ve Gama-aminobütrik asit (GABA) reseptörleri aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (Yang ve ark., 2011). Benzer bir deney tasarımı somatostatinin zorla yüzmeye testi sonrası hayvanlarda anti-depresan benzeri bir etki gösterdiği ve bu etkinin de GABA'dan bağımsız olduğu bildirilmiştir (Engin ve ark., 2008; Engin ve Treit, 2009).

Bizim çalışmamızda ise glutamaterjik sistem etkileri glutamat reseptörleri antagonistler ile bloke edilerek incelenmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında birbiri ile benzerlik göstermeyen sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu durum olası aktivasyon belirteci ya da antikor üretimi konusunda sıkıntılar dışlandığı takdirde ileride çalışmanın daha fazla deney hayvanı ile tekrarlandıktan sonra ancak glutamaterjik sistemin etkilerinin açıklanması daha doğru bilgiler sağlanacağı şeklinde yorumlanmıştır.

Ayrıca çalışma kapsamında kullanılan tüm dişi deney hayvanları östrus siklusları takip edilmeden deneye alınmıştır fakat nesfatin-1 ile yapılan ikili işaretlemelerde gruplar arasında istatistiksel değerlendirmeyi etkileyebilecek farklı bir sonuç ortaya çıkmamıştır. Nöronostatin ile yapılan ikili işaretlemelerde ise yalnızca dişi deney hayvanlarında değil erkek deney hayvanlarında çıkan sonuçlar da birbirinden oldukça farklı olarak belirlenmiştir.

Sunulan tez çalışması sonuçları ele alındığında literatürde ilk olacak farmakolojik ve klinik yaklaşımlara da katkı sağlayacak pek çok yeni veri elde edilmiştir;

- i. Çalışmada nesfatin-1 ve nöronostatin nöronlarının periferik stres sinyallerini algılayıp algılamadığının belirlenmesi amacıyla yapılan değerlendirmelerde nesfatin-1 nöronlarının, vücudun stres düzenleme mekanizması olan hipotalamik-hipofizier-adrenal aksta etkin olan CRFR-1, CRFR-2, GR ve MR molekülünü, nöronostatin nöronlarının ise GR'lerini eksprese ettiği, CRFR-1, CRFR-2 ve MR molekülünü ise protein düzeyinde eksprese etmediği belirlenmiştir. Hem nesfatin-1 hem de nöronostatin nöronları ile belirlenen reseptörlerin ko-ekspresyonlarının gösterilmesi literatürde ilktir.
- ii. Periferik sinyalleri aldığı belirlenen nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna neden olduğu ve bu besin alımının baskılanması yönünde etki sağlayabileceği gösterilmiştir. Literatürde immobilizasyon stresinin bu etkisi bilinmekle birlikte, çalışmalarımızda kullanılan zorla yüzdürme stresi ve enflamatuvar stres yaklaşımlarının da benzer etkiye sahip olduğu bilginiz dahilinde ilk kez gösterilmiştir. Enflamatuvar stresin diğer modellere göre farklı bir hipotalamik alanda yerleşik nesfatin-1 nöronları üzerinden etkili olmasının belirlenmesi literatür açısından önemli bir bulgudur.
- iii. Literatürde ilk kez nesfatin-1 nöronları aracılığıyla baskılanan besin alımında glutamaterjik sistemin etkili olduğu eksitator bir nörotransmitter olan endojen glutamatin, nesfatin-1 nöronları üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak etki gösterdiği, glutamat reseptörleri her stres grubu için ayrı ayrı değerlendirilerek çalışmada ortaya konmuştur. Nesfatin-1 nöronlarının strese bağlı aktivasyonunda glutamaterjik sistemin etkili olduğunun ilk defa belirlenmesi, literatüre bu yönde önemli katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında besin alımının baskınlanmasında rol alan ve çalışmada değerlendirilen nöronların periferik stres sinyallerini algılayabilecek reseptörleri protein düzeyinde sentezlediği ve bu yolla periferik dokuları etkileyebileceği, besin alımının akut stres durumlarında azalmasına nesfatin-1 nöronlarının aracılık edebileceği ve nesfatin-1 nöronal sisteminin strese bağlı aktivasyonunda glutamaterjik sistemin önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler ışığında stres ile oluşan besin alımı bozuklukları üzerine geliştirilecek ileri farmakolojik ve klinik araştırmalara bu çalışmada elde edilen verilen öncülük edebileceği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abelson JL, Khan S, Liberzon I ve ark. (2007) HPA Axis Activity in Patients with Panic Disorder: Review and Synthesis of Four Studies. *Depression and Anxiety*, doi:10.1002/da.20220.
- Aguilera G (2012) The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Neuroendocrine Responses to Stress. *Handbook of Neuroendocrinology*, Elsevier, pp. 175–196, doi:10.1016/B978-0-12-375097-6.10008-3.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C (2000) Vasopressinergic Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: Implications for Stress Adaptation. *Regulatory Peptides*, 2000, vol. 96, pp. 23–29, doi:10.1016/S0167-0115(00)00196-8.
- Akana SF, Cascio CS, Du JZ ve ark. (1986) Reset of Feedback in the Adrenocortical System: An Apparent Shift in Sensitivity of Adrenocorticotropin to Inhibition by Corticosterone between Morning and Evening*. *Endocrinology* vol. 119 no. (5): pp. 2325–2332., doi:10.1210/endo-119-5-2325.
- Aldenhoff J, Gruol D, Rivier J ve ark. (1983) Corticotropin Releasing Factor Decreases Postburst Hyperpolarizations and Excites Hippocampal Neurons. *Science* vol. 221 no. (4613): pp. 875–877., doi:10.1126/science.6603658.
- Pim A, Batty KA, Dodd CAS ve ark. (1985) Dissociation between Emotional and Endocrine Responses Preceding an Academic Examination in Male Medical Students. *Journal of Endocrinology* vol. 107 no. (2): pp. 163–170., doi:10.1677/joe.0.1070163.
- Aman NA, Nagarajan G, Kang SW ve ark. (2016) Differential Responses of the Vasotocin 1a Receptor (V1aR) and Osmoreceptors to Immobilization and Osmotic Stress in Sensory Circumventricular Organs of the Chicken (*Gallus Gallus*) Brain. *Brain Research* vol. 1649 October pp. 67–78., doi:10.1016/j.brainres.2016.08.028.
- Arase K, York DA, Shimizu H ve ark. (1988) Effects of Corticotropin-Releasing Factor on Food Intake and Brown Adipose Tissue Thermogenesis in Rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* vol. 255 no. (3): pp. E255–E259., doi:10.1152/ajpendo.1988.255.3.E255.
- Arborelius L, Owens M, Plotsky P ve ark. (1999) The Role of Corticotropin-

- Releasing Factor in Depression and Anxiety Disorders. *Journal of Endocrinology* vol. 160 no. (1): pp. 1–12., doi:10.1677/joe.0.1600001.
- Ari M, Ozturk OH, Bez Y ve ark. (2011) High Plasma Nesfatin-1 Level in Patients with Major Depressive Disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* vol. 35 no. (2): pp. 497–500., doi:10.1016/j.pnpbp.2010.12.004.
- Arriza J, Weinberger C, Cerelli G ve ark. (1987) Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor. *Science* vol. 237 no. (4812): pp. 268–275., doi:10.1126/science.3037703.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW ve ark. (1988) The Neuronal Mineralocorticoid Receptor as a Mediator of Glucocorticoid Response. *Neuron* vol. 1 no. (9): pp. 887–900., doi:10.1016/0896-6273(88)90136-5.
- Atkinson HC (2004) Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology* vol. 138 no. (9): pp. 3842–3848., doi:10.1210/en.138.9.3842.
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E ve ark. (2011) NMDA Receptor Blockade at Rest Triggers Rapid Behavioural Antidepressant Responses. *Nature* vol. 475 no. (7354): pp. 91–96., doi:10.1038/nature10130.
- Babb JA, Masini CV, Day HEW ve ark. (2013) Stressor-Specific Effects of Sex on HPA Axis Hormones and Activation of Stress-Related Neurocircuitry. *Stress* vol. 16 no. (6): pp. 664–677., doi:10.3109/10253890.2013.840282.
- Bale TL, Epperson CN (2015) Sex Differences and Stress across the Lifespan. *Nature Neuroscience* vol. 18 no. (10): pp. 1413–1420., doi:10.1038/nn.4112.
- Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF Receptors: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 44 no. (1): pp. 525–557., doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410.
- Barbu V, Neagu C, Dragan M (2015) Principal Component Analysis of Some Parameters Used for Lycopene Extraction from Tomatoes. *Acta Alimentaria* vol. 44 no. (4): pp. 473–481., doi:10.1556/AAlim.2015.0002.
- Barishay B, Roux J, Tardivel C ve ark. (2009) Brain-Derived Neurotrophic Factor/Tropomyosin-Related Kinase Receptor Type B Signaling Is a Downstream Effector of the Brainstem Melanocortin System in Food Intake Control. *Endocrinology* vol. 150 no. (6): pp. 2646–2653., doi:10.1210/en.2008-1184.
- Bastiaanssen TFS, Cowan CSM, Claesson MJ ve ark. (2018) Making Sense of the Microbiome in Psychiatry. *International Journal of Neuropsychopharmacology* vol. 22 no. (1): pp. 37–52., doi:10.1093/ijnp/pyy067.

- Baucum AJ (2017) Proteomic Analysis of Postsynaptic Protein Complexes Underlying Neuronal Plasticity. *ACS Chemical Neuroscience*, doi:10.1021/acscchemneuro.7b00008.
- Baxter LC (2016) Appetite Changes in Depression. *American Journal of Psychiatry* vol. 173 no. (4): pp. 317–318., doi:10.1176/appi.ajp.2016.16010010.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ ve ark. (2005) Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior. *Endocrinology*, doi:10.1210/en.2004-1142.
- Bernton EW, Beach JE, Holaday JW ve ark. (1987) Release of Multiple Hormones by a Direct Action of Interleukin-1 on Pituitary Cells. *Science* vol. 238 no. (4826): pp. 519–521., doi:10.1126/science.2821620.
- Berthoud HR (2002) Multiple Neural Systems Controlling Food Intake and Body Weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 26 no. (4): pp. 393–428., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204189>.
- Bez Y, Ari M, Ozturk OH ve ark. (2010) Plasma Nesfatin-1 Level May Be Associated with Disease Severity in Patients with Panic Disorder. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology* vol. 20 no. (4): pp. 288–292., doi:10.1080/10177833.2010.11790674.
- Bez Y, Ari M, Ozturk OH ve ark. (2012) Increased Plasma Nesfatin-1 Levels in Patients with Obsessive Compulsive Disorder. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology* vol. 22 no. (1): pp. 5–9., doi:10.5455/bcp.20110627110925.
- Biag J, Huang Y, Gou L ve ark. (2012) Cyto- and Chemoarchitecture of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus in the C57BL/6J Male Mouse: A Study of Immunostaining and Multiple Fluorescent Tract Tracing. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 520 no. (1): pp. 6–33., doi:10.1002/cne.22698.
- Blanchard DC, Spencer RL, Weiss SM ve ark. (1995) Visible Burrow System as a Model of Chronic Social Stress: Behavioral and Neuroendocrine Correlates. *Psychoneuroendocrinology* vol. 20 no. (2): pp. 117–134., doi:10.1016/0306-4530(94)E0045-B.
- Blas J (2015) Stress in Birds. *Sturkie's Avian Physiology*, Elsevier, pp. 769–810, doi:10.1016/B978-0-12-407160-5.00033-6.
- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG (2004) Evidence That Paraventricular Nucleus Oxytocin Neurons Link Hypothalamic Leptin Action to Caudal Brain Stem Nuclei Controlling Meal Size. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 287 no. (1): pp. R87–R96., doi:10.1152/ajpregu.00604.2003.
- Bloom FE, Battenberg ELF, Rivier J ve ark. (1982) Corticotropin Releasing

- Factor (CRF): Immunoreactive Neurones and Fibers in Rat Hypothalamus. *Regulatory Peptides* vol. 4 no. (1): pp. 43–48., doi:10.1016/0167-0115(82)90107-0.
- Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G (2005) Normal Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Function in a Rat Model of Peripheral Neuropathic Pain. *Brain Research* vol. 1044 no. (2): pp. 216–226., doi:10.1016/j.brainres.2005.03.005.
- Bonfiglio JJ, Inda C, Refojo D ve ark. (2011) The Corticotropin-Releasing Hormone Network and the Hypothalamic-Pituitary- Adrenal Axis: Molecular and Cellular Mechanisms Involved. *Neuroendocrinology* vol. 94 no. (1): pp. 12–20., doi:10.1159/000328226.
- Bonnet MS, Pecchi E, Trouslard J ve ark. (2009) Central Nesfatin-1-Expressing Neurons Are Sensitive to Peripheral Inflammatory Stimulus. *Journal of Neuroinflammation* vol. 6 no. (1): p. 27., doi:10.1186/1742-2094-6-27.
- Bradbury MJ, Akana SF, Cascio CS ve ark. (1991) Regulation of Basal ACTH Secretion by Corticosterone Is Mediated by Both Type I (MR) and Type II (GR) Receptors in Rat Brain. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* vol. 40 no. (1–3): pp. 133–142., doi:10.1016/0960-0760(91)90176-6.
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E ve ark. (2007) Nesfatin-1: Distribution and Interaction with a G Protein-Coupled Receptor in the Rat Brain. *Endocrinology* vol. 148 no. (10): pp. 5088–5094., doi:10.1210/en.2007-0701.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R ve ark. (1973) Hypothalamic Polypeptide That Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science* vol. 179 no. (4068): pp. 77–79., doi:10.1126/science.179.4068.77.
- Brochier T, Olié JP (1993) [Stress and Depression]. *L'Encephale* vol. 19 Spec No pp. 171–178., doi:10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.143938.
- Bromberg J, Darnell JE (2000) The Role of STATs in Transcriptional Control and Their Impact on Cellular Function. *Oncogene* vol. 19 no. (21): pp. 2468–2473., doi:10.1038/sj.onc.1203476.
- Burchfield SR (1979) The Stress Response: A New Perspective. *Psychosomatic Medicine*, doi:10.1097/00006842-197912000-00008.
- Cador M, Ahmed SH, Koob GF ve ark. (1992) Corticotropin-Releasing Factor Induces a Place Aversion Independent of Its Neuroendocrine Role. *Brain Research* vol. 597 no. (2): pp. 304–309., doi:10.1016/0006-8993(92)91487-Y.
- Cain DW, Cidlowski JA (2015) Specificity and Sensitivity of Glucocorticoid Signaling in Health and Disease. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 29 no. (4): pp. 545–556., doi:10.1016/j.beem.2015.04.007.

- Caldwell EE, Riccio DC (2010) Alcohol Self-Administration in Rats: Modulation by Temporal Parameters Related to Repeated Mild Social Defeat Stress. *Alcohol* vol. 44 no. (3): pp. 265–274., doi:10.1016/j.alcohol.2010.02.012.
- Cao B, Zhu J, Zuckerman H ve ark. (2019) Pharmacological Interventions Targeting Anhedonia in Patients with Major Depressive Disorder: A Systematic Review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* vol. 92 June pp. 109–117., doi:10.1016/j.pnpbp.2019.01.002.
- Cawley NX, Li Z, Loh YP (2016) Biosynthesis, Trafficking, and Secretion of pro-Opiomelanocortin-Derived Peptides. *Journal of Molecular Endocrinology*, doi:10.1530/JME-15-0323.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB (1995) Localization of Novel Corticotropin-Releasing Factor Receptor (CRF2) mRNA Expression to Specific Subcortical Nuclei in Rat Brain: Comparison with CRF1 Receptor mRNA Expression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* vol. 15 no. (10): pp. 6340–6350., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472399>.
- Chang CH, Hsiao YH, Chen YW ve ark. (2015) Social Isolation-Induced Increase in NMDA Receptors in the Hippocampus Exacerbates Emotional Dysregulation in Mice. *Hippocampus* vol. 25 no. (4): pp. 474–485., doi:10.1002/hipo.22384.
- Chang CP, Pearce RV, O’Connell S ve ark. (1993) Identification of a Seven Transmembrane Helix Receptor for Corticotropin-Releasing Factor and Sauvagine in Mammalian Brain. *Neuron* vol. 11 no. (6): pp. 1187–1195., doi:10.1016/0896-6273(93)90230-O.
- Chang YC, Kim HW, Rapoport SI ve ark. (2008) Chronic NMDA Administration Increases Neuroinflammatory Markers in Rat Frontal Cortex: Cross-Talk Between Excitotoxicity and Neuroinflammation. *Neurochemical Research* vol. 33 no. (11): pp. 2318–2323., doi:10.1007/s11064-008-9731-8.
- Chappell PB, Smith MA, Kilts CD ve ark. (1986) Alterations in Corticotropin-Releasing Factor-like Immunoreactivity in Discrete Rat Brain Regions after Acute and Chronic Stress. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* vol. 6 no. (10): pp. 2908–2914., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020187>.
- Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the Stress Response. *Annual Review of Physiology* vol. 67 no. (1): pp. 259–284., doi:10.1146/annurev.physiol.67.040403.120816.
- Chen J, Evans AN, Liu Y ve ark. (2012) Maternal Deprivation in Rats Is Associated with Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) Promoter Hypomethylation and Enhances CRH Transcriptional Responses to Stress in Adulthood. *Journal of Neuroendocrinology* vol. 24 no. (7): pp. 1055–1064., doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02306.x.

- Chen R, Lewis KA, Perrin MH ve ark. (2006) Expression Cloning of a Human Corticotropin-Releasing-Factor Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 90 no. (19): pp. 8967–8971., doi:10.1073/pnas.90.19.8967.
- Chen Z, Xu YY, Ge JF ve ark. (2018) CRHR1 Mediates the Up-Regulation of Synapsin I Induced by Nesfatin-1 Through ERK 1/2 Signaling in SH-SY5Y Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* vol. 38 no. (3): pp. 627–633., doi:10.1007/s10571-017-0509-x.
- Chun LE, Woodruff ER, Morton S ve ark. (2015) Variations in Phase and Amplitude of Rhythmic Clock Gene Expression across Prefrontal Cortex, Hippocampus, Amygdala, and Hypothalamic Paraventricular and Suprachiasmatic Nuclei of Male and Female Rats. *Journal of Biological Rhythms* vol. 30 no. (5): pp. 417–436., doi:10.1177/0748730415598608.
- Cole B (1988) Propranolol Antagonizes the Enhanced Conditioned Produced by Corticotropin Releasing Factor1 Environment in the Firing Rate of These Neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 902–910.
- Collins MO, Husi H, Yu L ve ark. (2006) Molecular Characterization and Comparison of the Components and Multiprotein Complexes in the Postsynaptic Proteome. *Journal of Neurochemistry* vol. 97 Suppl 1 pp. 16–23., doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03507.x.
- Cone RD (2005) Anatomy and Regulation of the Central Melanocortin System. *Nature Neuroscience* vol. 8 no. (5): pp. 571–578., doi:10.1038/nn1455.
- Cortright DN, Nicoletti A, Seasholtz AF (1995) Molecular and Biochemical Characterization of the Mouse Brain Corticotropin-Releasing Hormone-Binding Protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 111 no. (2): pp. 147–157., doi:10.1016/0303-7207(95)03558-O.
- Cramer T, Kisliouk T, Yeshurun S ve ark. (2015) The Balance between Stress Resilience and Vulnerability Is Regulated by Corticotropin-Releasing Hormone during the Critical Postnatal Period for Sensory Development. *Developmental Neurobiology* vol. 75 no. (8): pp. 842–853., doi:10.1002/dneu.22252.
- Cunanan AJ, DeWeese BH, Wagle JP ve ark. (2018) The General Adaptation Syndrome: A Foundation for the Concept of Periodization. *Sports Medicine* vol. 48 no. (4): pp. 787–797., doi:10.1007/s40279-017-0855-3.
- Cunningham ET, Sawchenko PE (1991) Reflex Control of Magnocellular Vasopressin and Oxytocin Secretion. *Trends in Neurosciences* vol. 14 no. (9): pp. 406–411., doi:10.1016/0166-2236(91)90032-P.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS ve ark. (1987) Regulation of ACTH Secretion: Variations on a Theme of B. *Proceedings of the 1986 Laurentian Hormone Conference*, Elsevier, pp. 113–173, doi:10.1016/B978-0-12-571143-2.50010-1.

- Day TA, Walker FR (2007) More Appraisal Please: A Commentary on Pfaff et Al. (2007) "Relations between Mechanisms of CNS Arousal and Mechanisms of Stress." *Stress*, doi:10.1080/10253890701638204.
- De Graaf-Roelfsema E, Keizer HA, van Breda E ve ark. (2007) Hormonal Responses to Acute Exercise, Training and Overtraining a Review with Emphasis on the Horse. *Veterinary Quarterly*, doi:10.1080/01652176.2007.9695232.
- De Kloet ER (1998) Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease. *Endocrine Reviews* vol. 19 no. (3): pp. 269–301., doi:10.1210/er.19.3.269.
- De Kloet ER (2014) From Receptor Balance to Rational Glucocorticoid Therapy. *Endocrinology*, doi:10.1210/en.2014-1048.
- De Kloet ER, Acker SV, Sibug RM ve ark. (2000) Brain Mineralocorticoid Receptors and Centrally Regulated Functions. *Kidney International* vol. 57 no. (4): pp. 1329–1336., doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00971.x.
- De Kloet ER, Veldhuis HD, Wagenaars JL ve ark. (1984) Relative Binding Affinity of Steroids for the Corticosterone Receptor System in Rat Hippocampus. *Journal of Steroid Biochemistry* vol. 21 no. (2): pp. 173–178., doi:10.1016/0022-4731(84)90380-7.
- De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the Brain: From Adaptation to Disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, doi:10.1038/nrn1683.
- De Pedro N, Alonso-Gómez AL, Gancedo B ve ark. (1993) Role of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) as a Food Intake Regulator in Goldfish. *Physiology & Behavior* vol. 53 no. (3): pp. 517–520., doi:10.1016/0031-9384(93)90146-7.
- De Souza E (1987) Corticotropin-Releasing Factor Receptors in the Rat Central Nervous System: Characterization and Regional Distribution. *The Journal of Neuroscience* vol. 7 no. (1): pp. 88–100., doi:10.1523/JNEUROSCI.07-01-00088.1987.
- De Souza EB (1995) Corticotropin-Releasing Factor Receptors: Physiology, Pharmacology, Biochemistry and Role in Central Nervous System and Immune Disorders. *Psychoneuroendocrinology* vol. 20 no. (8): pp. 789–819., doi:10.1016/0306-4530(95)00011-9.
- Dhillon WS, Small CJ, Seal LJ ve ark. (2002) The Hypothalamic Melanocortin System Stimulates the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Vitro and in Vivo in Male Rats. *Neuroendocrinology* vol. 75 no. (4): pp. 209–216., doi:10.1159/000054712.
- Dickmeis T, Weger BD, Weger M (2013) The Circadian Clock and Glucocorticoids - Interactions across Many Time Scales. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 380 no. (1–2): pp. 2–15.,

doi:10.1016/j.mce.2013.05.012.

- Dockray S, Steptoe A (2011) Chronotype and Diurnal Cortisol Profile in Working Women: Differences between Work and Leisure Days. *Psychoneuroendocrinology* vol. 36 no. (5): pp. 649–655., doi:10.1016/j.psyneuen.2010.09.008.
- Dostert A, Heinzl T (2004) Negative Glucocorticoid Receptor Response Elements and Their Role in Glucocorticoid Action. *Current Pharmaceutical Design* vol. 10 no. (23): pp. 2807–2816., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15379669>.
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W ve ark. (2010) A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biological Psychiatry* vol. 67 no. (5): pp. 446–457., doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033.
- Droste SK, Groote DL, Lightman SL ve ark. (2009) The Ultradian and Circadian Rhythms of Free Corticosterone in the Brain Are Not Affected by Gender: An in Vivo Microdialysis Study in Wistar Rats. *Journal of Neuroendocrinology* vol. 21 no. (2): pp. 132–140., doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01811.x.
- Drouin J, Sun YL, Chamberland M ve ark. (1993) Novel Glucocorticoid Receptor Complex with DNA Element of the Hormone-Repressed POMC Gene. *The EMBO Journal* vol. 12 no. (1): pp. 145–156., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8428574> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC413186>.
- Dubois DC, Sukumaran S, Jusko WJ ve ark. (2013) Evidence for a Glucocorticoid Receptor Beta Splice Variant in the Rat and Its Physiological Regulation in Liver. *Steroids* vol. 78 no. (2): pp. 312–320., doi:10.1016/j.steroids.2012.11.014.
- Dun SL, Brailoiu GC, Tica AA ve ark. (2010) Neuronostatin Is Co-Expressed with Somatostatin and Mobilizes Calcium in Cultured Rat Hypothalamic Neurons. *Neuroscience* vol. 166 no. (2): pp. 455–463., doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.059.
- Dunn AJ, Berridge CW (1987) Corticotropin-Releasing Factor Administration Elicits a Stress-like Activation of Cerebral Catecholaminergic Systems. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* vol. 27 no. (4): pp. 685–691., doi:10.1016/0091-3057(87)90195-X.
- Dunn AJ, Berridge CW (1990) Physiological and Behavioral Responses to Corticotropin-Releasing Factor Administration: Is CRF a Mediator of Anxiety or Stress Responses?. *Brain Research Reviews* vol. 15 no. (2): pp. 71–100., doi:10.1016/0165-0173(90)90012-D.
- Eghbal-Ahmadi M, Hatalski CG, Avishai-Eliner S ve ark. (1997) Corticotropin Releasing Factor Receptor Type II (CRF2) Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Hypothalamic Ventromedial Nucleus of the Infant Rat Are

- Reduced by Maternal Deprivation. *Endocrinology* vol. 138 no. (11): pp. 5048–5051., doi:10.1210/endo.138.11.5647.
- Elrick MM, Samson WK, Corbett JA ve ark. (2016) Neuronostatin Acts via GPR107 to Increase CAMP-Independent PKA Phosphorylation and Proglucagon mRNA Accumulation in Pancreatic α -Cells. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 310 no. (2): pp. R143–R155., doi:10.1152/ajpregu.00369.2014.
- Emmerzaal T, Kozicz T (2013) Nesfatin-1; Implication in Stress and Stress-Associated Anxiety and Depression. *Current Pharmaceutical Design* vol. 19 no. (39): pp. 6941–6948., doi:10.2174/138161281939131127125042.
- Engin E, Stellbrink J, Treit D ve ark. (2008) Anxiolytic and Antidepressant Effects of Intracerebroventricularly Administered Somatostatin: Behavioral and Neurophysiological Evidence. *Neuroscience* vol. 157 no. (3): pp. 666–676., doi:10.1016/j.neuroscience.2008.09.037.
- Engin E, Treit D (2009) Anxiolytic and Antidepressant Actions of Somatostatin: The Role of Sst2 and Sst3 Receptors. *Psychopharmacology* vol. 206 no. (2): pp. 281–289., doi:10.1007/s00213-009-1605-5.
- Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnäs-Moberg K ve ark. (1996) Expression of Fos-Related Antigens, Oxytocin, Dynorphin and Galanin in the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of Lactating Rats. *Neuroendocrinology* vol. 63 no. (4): pp. 356–367., doi:10.1159/000126976.
- Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK (2008) The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus – a Potential Target for Integrative Treatment of Autonomic Dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* vol. 12 no. (6): pp. 717–727., doi:10.1517/14728222.12.6.717.
- Figueiredo HF, Dolgas CM, Herman JP (2002) Stress Activation of Cortex and Hippocampus Is Modulated by Sex and Stage of Estrus. *Endocrinology* vol. 143 no. (7): pp. 2534–2540., doi:10.1210/endo.143.7.8888.
- Fink G, Robinson IC, Tannahill LA (1988) Effects of Adrenalectomy and Glucocorticoids on the Peptides CRF-41, AVP and Oxytocin in Rat Hypophysial Portal Blood. *The Journal of Physiology* vol. 401 no. (1): pp. 329–345., doi:10.1113/jphysiol.1988.sp017165.
- Fink G, Pfaff D, Levine J (2012) *Handbook of Neuroendocrinology* Handbook of Neuroendocrinology, Elsevier.
- Fink G, Rosie R, Sheward WJ ve ark. (1991) Steroid Control of Central Neuronal Interactions and Function. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* vol. 40 no. (1–3): pp. 123–132., doi:10.1016/0960-0760(91)90175-5.
- Foo KS, Brismar H, Broberger C (2008) Distribution and Neuropeptide Coexistence of Nucleobindin-2 mRNA/Nesfatin-like Immunoreactivity in

- the Rat CNS. *Neuroscience* vol. 156 no. (3): pp. 563–579., doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.054.
- Fort P, Salvart D, Hanriot L ve ark. (2008) The Satiety Molecule Nesfatin-1 Is Co-Expressed with Melanin Concentrating Hormone in Tuberal Hypothalamic Neurons of the Rat. *Neuroscience* vol. 155 no. (1): pp. 174–181., doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.035.
- Gagliano H, Fuentes S, Nadal R ve ark. (2008) Previous Exposure to Immobilisation and Repeated Exposure to a Novel Environment Demonstrate a Marked Dissociation between Behavioral and Pituitary-Adrenal Responses. *Behavioural Brain Research* vol. 187 no. (2): pp. 239–245., doi:10.1016/j.bbr.2007.09.006.
- Gao X, Zhang K, Song M ve ark. (2016) Role of Nesfatin-1 in the Reproductive Axis of Male Rat. *Scientific Reports* vol. 6 no. (1): p. 32877., doi:10.1038/srep32877.
- García-Pardo MP, Miñarro J, Llansola M ve ark. (2018) Role of NMDA and AMPA Glutamatergic Receptors in the Effects of Social Defeat on the Rewarding Properties of MDMA in Mice. *European Journal of Neuroscience*, October, doi:10.1111/ejn.14190.
- Ge JF, Xu YY, Qin G ve ark. (2015) Nesfatin-1, a Potent Anorexic Agent, Decreases Exploration and Induces Anxiety-like Behavior in Rats without Altering Learning or Memory. *Brain Research* vol. 1629 December pp. 171–181., doi:10.1016/j.brainres.2015.10.027.
- Ge JF, Xu YY, Qin G ve ark. (2015) Depression-like Behavior Induced by Nesfatin-1 in Rats: Involvement of Increased Immune Activation and Imbalance of Synaptic Vesicle Proteins. *Frontiers in Neuroscience* vol. 9 no. (NOV);, doi:10.3389/fnins.2015.00429.
- Geerling JC, Shin JW, Chimenti PC ve ark. (2010) Paraventricular Hypothalamic Nucleus: Axonal Projections to the Brainstem. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 518 no. (9): pp. 1460–1499., doi:10.1002/cne.22283.
- Ghasemi M, Phillips C, Trillo L ve ark. (2014) The Role of NMDA Receptors in the Pathophysiology and Treatment of Mood Disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 47 November pp. 336–358., doi:10.1016/j.neubiorev.2014.08.017.
- Ghosh A, Dinakaran D, Nebhinani N ve ark. (2017) Association between Depression and Metabolic Syndrome: Critical Issues and Missed Opportunities. *Indian Journal of Psychiatry* vol. 59 no. (2): p. 247., doi:10.4103/psychiatry.indianjpsychiatry_97_17.
- Girotti M, Pace TWW, Gaylord RI ve ark. (2006) Habituation to Repeated Restraint Stress Is Associated with Lack of Stress-Induced c-Fos Expression in Primary Sensory Processing Areas of the Rat Brain. *Neuroscience* vol. 138 no. (4): pp. 1067–1081., doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.002.

- Goebel-Stengel M, Wang L (2013) Central and Peripheral Expression and Distribution of NUCB2/Nesfatin-1. *Current Pharmaceutical Design* vol. 19 no. (39): pp. 6935–6940., doi:10.2174/138161281939131127124814.
- Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A ve ark. (2011) Localization of Nesfatin-1 Neurons in the Mouse Brain and Functional Implication. *Brain Research* vol. 1396 June pp. 20–34., doi:10.1016/j.brainres.2011.04.031.
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NWG ve ark. (2009) Nesfatin-1 Immunoreactivity in Rat Brain and Spinal Cord Autonomic Nuclei. *Neuroscience Letters* vol. 452 no. (3): pp. 241–246., doi:10.1016/j.neulet.2009.01.064.
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y (2009) Restraint Stress Activates Nesfatin-1-Immunoreactive Brain Nuclei in Rats. *Brain Research* vol. 1300 pp. 114–124., doi:10.1016/j.brainres.2009.08.082.
- Gunay H, Tutuncu R, Aydin S ve ark. (2012) Decreased Plasma Nesfatin-1 Levels in Patients with Generalized Anxiety Disorder. *Psychoneuroendocrinology* vol. 37 no. (12): pp. 1949–1953., doi:10.1016/j.psyneuen.2012.04.007.
- Gurdjian ES (1927) The Diencephalon of the Albino Rat. *Journal of Comparative Neurology* vol. 43 no. (1): pp. 1–114.
- Haas DA, George SR (1988) Single or Repeated Mild Stress Increases Synthesis and Release of Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor. *Brain Research* vol. 461 no. (2): pp. 230–237., doi:10.1016/0006-8993(88)90254-5.
- Handa RJ, Weiser MJ (2014) Gonadal Steroid Hormones and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, doi:10.1016/j.yfrne.2013.11.001.
- Hansen KB, Yi F, Perszyk RE ve ark. (2018) Structure, Function, and Allosteric Modulation of NMDA Receptors. *J. Gen. Physiol* vol. 150 no. (8): pp. 1081–1105., doi:10.1085/jgp.201812032.
- Hashimoto K, Malchow B, Falkai P ve ark. (2013) Glutamate Modulators as Potential Therapeutic Drugs in Schizophrenia and Affective Disorders. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* vol. 263 no. (5): pp. 367–377., doi:10.1007/s00406-013-0399-y.
- Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF (1991) Both Conditioned Taste Preference and Aversion Induced by Corticotropin-Releasing Factor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* vol. 40 no. (4): pp. 717–721., doi:10.1016/0091-3057(91)90075-D.
- Heinrichs SC, Koob GF (1992) Corticotropin-Releasing Factor Modulates Dietary Preference in Nutritionally and Physically Stressed Rats. *Psychopharmacology* vol. 109 no. (1–2): pp. 177–184., doi:10.1007/BF02245497.

- Heisler LK, Cowley MA, Kishi T ve ark. (2003) Central Serotonin and Melanocortin Pathways Regulating Energy Homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 994 no. (1): pp. 169–174., doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb03177.x.
- Hellhammer DH, Wüst S, Kudielka BM (2009) Salivary Cortisol as a Biomarker in Stress Research. *Psychoneuroendocrinology* vol. 34 no. (2): pp. 163–171., doi:10.1016/j.psyneuen.2008.10.026.
- Herman JP, Cullinan WE (1997) Neurocircuitry of Stress: Central Control of the Hypothalamo–Pituitary–Adrenocortical Axis. *Trends in Neurosciences* vol. 20 no. (2): pp. 78–84., doi:10.1016/S0166-2236(96)10069-2.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK ve ark. (2003) Central Mechanisms of Stress Integration: Hierarchical Circuitry Controlling Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology* vol. 24 no. (3): pp. 151–180., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14596810>.
- Herman JP, Schäfer MKH, Sladek CD ve ark. (1989) Chronic Electroconvulsive Shock Treatment Elicits Up-Regulation of CRF and AVP MRNA in Select Populations of Neuroendocrine Neurons. *Brain Research* vol. 501 no. (2): pp. 235–246., doi:10.1016/0006-8993(89)90641-0.
- Herman JP, Tasker JG (2016) Paraventricular Hypothalamic Mechanisms of Chronic Stress Adaptation. *Frontiers in Endocrinology* vol. 7 no. (OCT): pp. 1–10., doi:10.3389/fendo.2016.00137.
- Herman JP, Watson SJ, Spencer RL (1999) Defense of Adrenocorticosteroid Receptor Expression in Rat Hippocampus: Effects of Stress and Strain. *Endocrinology* vol. 140 no. (9): pp. 3981–3991., doi:10.1210/endo.140.9.6962.
- Heydendael W, Jacobson L (2009) Glucocorticoid Status Affects Antidepressant Regulation of Locus Coeruleus Tyrosine Hydroxylase and Dorsal Raphe Tryptophan Hydroxylase Gene Expression. *Brain Research* vol. 1288 September pp. 69–78., doi:10.1016/j.brainres.2009.06.082.
- Hinds TD, Ramakrishnan S, Cash HA ve ark. (2010) Discovery of Glucocorticoid Receptor- β in Mice with a Role in Metabolism. *Molecular Endocrinology* vol. 24 no. (9): pp. 1715–1727., doi:10.1210/me.2009-0411.
- Hiroshige T, Fujieda K, Kaneko M ve ark. (1977) Assays and Dynamics of Corticotropin-Releasing Factor Activity in Rat Hypothalamus. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 297 no. (1 ACTH and Rela): pp. 436–454., doi:10.1111/j.1749-6632.1977.tb41874.x.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) C-Fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* vol. 14 no. (3): pp. 173–213., doi:10.1006/frne.1993.1006.

- Hofmann T, Ahnis A, Elbelt U ve ark. (2015) NUCB2/Nesfatin-1 Is Associated with Elevated Levels of Anxiety in Anorexia Nervosa. *PLoS ONE*. Silvana Gaetani vol. 10 no. (7): p. e0132058., doi:10.1371/journal.pone.0132058.
- Hofmann T, Elbelt U, Ahnis A ve ark. (2015) Sex-Specific Regulation of NUCB2/Nesfatin-1: Differential Implication in Anxiety in Obese Men and Women. *Psychoneuroendocrinology* vol. 60 October pp. 130–137., doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.014.
- Hofmann T, Stengel A, Ahnis A ve ark. (2013) NUCB2/Nesfatin-1 Is Associated with Elevated Scores of Anxiety in Female Obese Patients. *Psychoneuroendocrinology* vol. 38 no. (11): pp. 2502–2510., doi:10.1016/j.psyneuen.2013.05.013.
- Hofmann T, Weibert E, Ahnis A ve ark. (2017) Alterations of Circulating NUCB2/Nesfatin-1 during Short Term Therapeutic Improvement of Anxiety in Obese Inpatients. *Psychoneuroendocrinology* vol. 79 May pp. 107–115., doi:10.1016/j.psyneuen.2017.02.021.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES ve ark. (1985) Primary Structure and Expression of a Functional Human Glucocorticoid Receptor cDNA. *Nature* vol. 318 no. (6047): pp. 635–641., doi:10.1038/318635a0.
- Holsboer F (2000) The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. *Neuropsychopharmacology* vol. 23 no. (5): pp. 477–501., doi:10.1016/S0893-133X(00)00159-7.
- Hu J, Yang N, Ma Y ve ark. (2004) Identification of Glutamate Transporters and Receptors in Mouse Testis. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 25 no. (3): pp. 366–371., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15000892>.
- Hua Y, Ma H, Samson WK ve ark. (2009) Neuronostatin Inhibits Cardiac Contractile Function via a Protein Kinase A- and JNK-Dependent Mechanism in Murine Hearts. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 297 no. (3): pp. R682–R689., doi:10.1152/ajpregu.00196.2009.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS ve ark. (2000) Proteomic Analysis of NMDA Receptor–Adhesion Protein Signaling Complexes. *Nature Neuroscience* vol. 3 no. (7): pp. 661–669., doi:10.1038/76615.
- Imaki T, Katsumata H, Miyata M ve ark. (2001) Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Type 1 Receptor in Paraventricular Nucleus after Acute Stress. *Neuroendocrinology* vol. 73 no. (5): pp. 293–301., doi:10.1159/000054646.
- Imaki T, Naruse M, Harada S ve ark. (1996) Corticotropin-Releasing Factor up-Regulates Its Own Receptor mRNA in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *Molecular Brain Research* vol. 38 no. (1): pp. 166–170., doi:10.1016/0169-328X(96)00011-3.

- Imaki T, Shibasaki T, Demura H (1995) Regulation of Gene Expression in the Central Nervous System by Stress: Molecular Pathways of Stress Responses. *Endocrine Journal* vol. 42 no. (2): pp. 121–130., doi:10.1507/endocrj.42.121.
- Inhoff T, Stengel A, Peter L ve ark. (2010) Novel Insight in Distribution of Nesfatin-1 and Phospho-MTOR in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus of Rats. *Peptides* vol. 31 no. (2): pp. 257–262., doi:10.1016/j.peptides.2009.11.024.
- Ishunina TA (1999) Vasopressin and Oxytocin Neurons of the Human Supraoptic and Paraventricular Nucleus; Size Changes in Relation to Age and Sex. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* vol. 84 no. (12): pp. 4637–4644., doi:10.1210/jc.84.12.4637.
- Jacoby S, Singh AB, Cornett LE ve ark. (1997) Arginine Vasotocin Gene Expression and Secretion during Osmotic Stimulation and Hemorrhagic Hypotension in Hens. *General and Comparative Endocrinology* vol. 106 no. (3): pp. 327–337., doi:10.1006/gcen.1997.6872.
- Jacobson L, Muglia LJ, Weninger SC ve ark. (2000) CRH Deficiency Impairs but Does Not Block Pituitary-Adrenal Responses to Diverse Stressors. *Neuroendocrinology* vol. 71 no. (2): pp. 79–87., doi:10.1159/000054524.
- Jeanneteau FD, Lambert WM, Ismaili N ve ark. (2012) BDNF and Glucocorticoids Regulate Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) Homeostasis in the Hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 109 no. (4): pp. 1305–1310., doi:10.1073/pnas.1114122109.
- Joëls M, Baram TZ (2009) The Neuro-Symphony of Stress. *Nature Reviews. Neuroscience*, doi:10.1038/nrn2632.
- Kalman BA, Kim PJ, Cole MA ve ark. (1997) Diazepam Attenuation of Restraint Stress-Induced Corticosterone Levels Is Enhanced by Prior Exposure to Repeated Restraint. *Psychoneuroendocrinology* vol. 22 no. (5): pp. 349–360., doi:10.1016/S0306-4530(97)00026-7.
- Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J ve ark. (2012) Circadian Rhythms in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, doi:10.1016/j.mce.2011.06.042.
- Kang SW, Kuenzel WJ (2014) Regulation of Gene Expression of Vasotocin and Corticotropin-Releasing Hormone Receptors in the Avian Anterior Pituitary by Corticosterone. *General and Comparative Endocrinology* vol. 204 August pp. 25–32., doi:10.1016/j.ygcen.2014.04.018.
- Kaszaki J, Érces D, Varga G ve ark. (2012) Kynurenines and Intestinal Neurotransmission: The Role of N-Methyl-d-Aspartate Receptors. *Journal of Neural Transmission* vol. 119 no. (2): pp. 211–223., doi:10.1007/s00702-011-0658-x.
- Kawashima S, Sakihara S, Kageyama K ve ark. (2008) Corticotropin-Releasing

- Factor (CRF) Is Involved in the Acute Anorexic Effect of α -Melanocyte-Stimulating Hormone: A Study Using CRF-Deficient Mice. *Peptides* vol. 29 no. (12): pp. 2169–2174., doi:10.1016/j.peptides.2008.09.010.
- Keller-Wood ME, Dallman MF (1984) Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion*. *Endocrine Reviews* vol. 5 no. (1): pp. 1–24., doi:10.1210/edrv-5-1-1.
- Khachaturian H, Lewis ME, Alessi NE ve ark. (1985) Time of Origin of Opioid Peptide-Containing Neurons in the Rat Hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 236 no. (4): pp. 538–546., doi:10.1002/cne.902360409.
- Kirschbaum C, Kudielka BM, Gaab J ve ark. (1999) Impact of Gender, Menstrual Cycle Phase, and Oral Contraceptives on the Activity of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Psychosomatic Medicine* vol. 61 no. (2): pp. 154–162., doi:10.1097/00006842-199903000-00006.
- Klaff LJ, Taborsky GJ (1987a) Pancreatic Somatostatin Is a Mediator of Glucagon Inhibition by Hyperglycemia. *Diabetes* vol. 36 no. (5): pp. 592–596., doi:10.2337/diab.36.5.592.
- Klaff LJ, Taborsky GJ (1987b) Role of Pancreatic Somatostatin in Determining Glucagon Response to Arginine and Morphine. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* vol. 252 no. (6): pp. E751–E755., doi:10.1152/ajpendo.1987.252.6.E751.
- Kloet de ER (1993) The Influence of Ovarian Steroids Regulation in the Female Rat. *Journal of Endocrinology*.
- Könczöl K, Pintér O, Ferenczi S ve ark. (2012) Nesfatin-1 Exerts Long-Term Effect on Food Intake and Body Temperature. *International Journal of Obesity* vol. 36 no. (12): pp. 1514–1521., doi:10.1038/ijo.2012.2.
- Könczöl K, Bodnár I, Zelena D ve ark. (2010) Nesfatin-1/NUCB2 May Participate in the Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Rats. *Neurochemistry International* vol. 57 no. (3): pp. 189–197., doi:10.1016/j.neuint.2010.04.012.
- Koob GF (1999) Corticotropin-Releasing Factor, Norepinephrine, and Stress. *Biological Psychiatry* vol. 46 no. (9): pp. 1167–1180., doi:10.1016/S0006-3223(99)00164-X.
- Koolhaas JM, Bartolomucci A, Buwalda B ve ark. (2011) Stress Revisited: A Critical Evaluation of the Stress Concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, doi:10.1016/j.neubiorev.2011.02.003.
- Kovács KJ, Földes A, Sawchenko PE (2000) Glucocorticoid Negative Feedback Selectively Targets Vasopressin Transcription in Parvocellular Neurosecretory Neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* vol. 20 no. (10): pp. 3843–3852.,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10804224>.

- Kovács KJ, Makara GB (1988) Corticosterone and Dexamethasone Act at Different Brain Sites to Inhibit Adrenalectomy-Induced Adrenocorticotropin Hypersecretion. *Brain Research* vol. 474 no. (2): pp. 205–210., doi:10.1016/0006-8993(88)90435-0.
- Krahn DD, Gosnell BA, Grace M ve ark. (1986) CRF Antagonist Partially Reverses CRF- and Stress-Induced Effects on Feeding. *Brain Research Bulletin* vol. 17 no. (3): pp. 285–289., doi:10.1016/0361-9230(86)90233-9.
- Krozowski ZS, SE Rundle, C Wallace ve ark. (1989) Immunolocalization of Renal Mineralocorticoid Receptors with an Antiserum against a Peptide Deduced from the Complementary Deoxyribonucleic Acid Sequence. *Endocrinology* vol. 125 no. (1): pp. 192–198., doi:10.1210/endo-125-1-192.
- Krystal JH, Sanacora G, Duman RS (2013) Rapid-Acting Glutamatergic Antidepressants: The Path to Ketamine and Beyond. *Biological Psychiatry* vol. 73 no. (12): pp. 1133–1141., doi:10.1016/j.biopsych.2013.03.026.
- Kuenzel WJ, Kang SW, Jurkevich A (2013) Neuroendocrine Regulation of Stress in Birds with an Emphasis on Vasotocin Receptors (VTRs). *General and Comparative Endocrinology* vol. 190 September pp. 18–23., doi:10.1016/j.ygcen.2013.02.029.
- Kula B, Chen T, Kukley M (2019) Glutamatergic Signaling between Neurons and Oligodendrocyte Lineage Cells: Is It Synaptic or Non-synaptic?. *Glia*, no. March (April) p. glia.23617., doi:10.1002/glia.23617.
- Lacroix S, Rivest S (1996) Role of Cyclo-Oxygenase Pathways in the Stimulatory Influence of Immune Challenge on the Transcription of a Specific CRF Receptor Subtype in the Rat Brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* vol. 10 no. (1): pp. 53–71., doi:10.1016/0891-0618(95)00106-9.
- Lazar T (2003) *Histology and Cell Biology—An Introduction to Pathology Tissue and Cell*.
- Lee S, Rivier C (1997) Alcohol Increases the Expression of Type 1, but Not Type 2 α Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Hypothalamus. *Molecular Brain Research* vol. 52 no. (1): pp. 78–89., doi:10.1016/S0169-328X(97)00226-X.
- Lehnert H, Schulz C, Dieterich K (1998) Physiological and Neurochemical Aspects of Corticotropin-Releasing Factor Actions in the Brain: The Role of the Locus Coeruleus. *Neurochemical Research* vol. 23 no. (8): pp. 1039–1052., doi:10.1023/A:1020751817723.
- Lei S, Czerwinska E, Czerwinski W ve ark. (2018) Regulation of NMDA Receptor Activity by F-Actin and Myosin Light Chain Kinase. *The Journal of Neuroscience* vol. 21 no. (21): pp. 8464–8472., doi:10.1523/jneurosci.21-

21-08464.2001.

- Lepack AE, Bang E, Lee B ve ark. (2016) Fast-Acting Antidepressants Rapidly Stimulate ERK Signaling and BDNF Release in Primary Neuronal Cultures. *Neuropharmacology* vol. 111 December pp. 242–252., doi:10.1016/j.neuropharm.2016.09.011.
- Levine AB, Levine LM, Levine TB (2014) Posttraumatic Stress Disorder and Cardiometabolic Disease. *Cardiology* vol. 127 no. (1): pp. 1–19., doi:10.1159/000354910.
- Li N, Lee B, Liu RJ ve ark. (2010) MTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. *Science* vol. 329 no. (5994): pp. 959–964., doi:10.1126/science.1190287.
- Li Z, Gao L, Tang H ve ark. (2013) Peripheral Effects of Nesfatin-1 on Glucose Homeostasis. *PLoS ONE*. Makoto Kanzaki vol. 8 no. (8): p. e71513., doi:10.1371/journal.pone.0071513.
- Lightman SL, MS Harbuz (2007) Expression of Corticotropin-Releasing Factor MRNA in Response to Stress., pp. 173–203, doi:10.1002/9780470514368.ch9.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The Molecular Basis of CaMKII Function in Synaptic and Behavioural Memory. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 3 no. (3): pp. 175–190., doi:10.1038/nrn753.
- Lodge D, Mercier MS (2015) Ketamine and Phencyclidine: The Good, the Bad and the Unexpected. *British Journal of Pharmacology* vol. 172 no. (17): pp. 4254–4276., doi:10.1111/bph.13222.
- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE ve ark. (1995) Cloning and Characterization of a Functionally Distinct Corticotropin-Releasing Factor Receptor Subtype from Rat Brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 92 no. (3): pp. 836–840., doi:10.1073/pnas.92.3.836.
- Lovenberg TW, Chalmerst DT, Liu C ve ark. (1995) Crf2 α and Crf2 β Receptor MRNAS Are Differentially Distributed between the Rat Central Nervous System and Peripheral Tissues. *Endocrinology* vol. 136 no. (9): pp. 4139–4142., doi:10.1210/endo.136.9.7544278.
- Lu XY, Barsh GS, Akil H ve ark. (2003) Interaction between α -Melanocyte-Stimulating Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Feeding and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Responses. *The Journal of Neuroscience* vol. 23 no. (21): pp. 7863–7872., doi:10.1523/JNEUROSCI.23-21-07863.2003.
- Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S ve ark. (2009) Nesfatin-1-Regulated Oxytocinergic Signaling in the Paraventricular Nucleus Causes Anorexia through a Leptin-Independent Melanocortin Pathway. *Cell Metabolism* vol. 10 no. (5): pp. 355–365., doi:10.1016/j.cmet.2009.09.002.

- Majzoub JA (2006) Corticotropin-Releasing Hormone Physiology. *European Journal of Endocrinology* vol. 155 no. (suppl_1): pp. S71–S76., doi:10.1530/eje.1.02247.
- Makino S, Nishiyama M, Asaba K ve ark. (2017) Altered Expression of Type 2 CRH Receptor mRNA in the VMH by Glucocorticoids and Starvation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 275 no. (4): pp. R1138–R1145., doi:10.1152/ajpregu.1998.275.4.r1138.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M ve ark. (1995) The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* vol. 83 no. (6): pp. 835–839., doi:10.1016/0092-8674(95)90199-X.
- Mansi JA, Rivest S, Drolet G (1996) Regulation of Corticotropin-Releasing Factor Type 1 (CRF1) Receptor Messenger Ribonucleic Acid in the Paraventricular Nucleus of Rat Hypothalamus by Exogenous CRF. *Endocrinology* vol. 137 no. (11): pp. 4619–4629., doi:10.1210/endo.137.11.8895325.
- Marek GJ, Behl B, Beshpalov AY ve ark. (2010) Glutamatergic (N-Methyl-D-Aspartate Receptor) Hypofrontality in Schizophrenia: Too Little Juice or a Miswired Brain?. *Molecular Pharmacology* vol. 77 no. (3): pp. 317–326., doi:10.1124/mol.109.059865.
- Mattson MP (2000) Turning off the Anxiety Master Switch. *Trends in Neurosciences* vol. 23 no. (8): p. 333., doi:10.1016/S0166-2236(00)01652-0.
- McEwen BS, de Kloet ER, W Rostene (1986) Adrenal Steroid Receptors and Actions in the Nervous System. *Physiological Reviews* vol. 66 no. (4): pp. 1121–1188., doi:10.1152/physrev.1986.66.4.1121.
- McEwen BS. (2008) Central Effects of Stress Hormones in Health and Disease: Understanding the Protective and Damaging Effects of Stress and Stress Mediators. *European Journal of Pharmacology*, doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.071.
- McEwen Bruce S, Gianaros PJ (2010) Central Role of the Brain in Stress and Adaptation: Links to Socioeconomic Status, Health, and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1186 no. (1): pp. 190–222., doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x.
- Menzaghi F, Howard RL, Heinrichs SC ve ark. (1994) Characterization of a Novel and Potent Corticotropin-Releasing Factor Antagonist in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol. 269 no. (2): pp. 564–72.
- Merali Z, Cayer C, Kent P ve ark. (2008) Nesfatin-1 Increases Anxiety- and Fear-Related Behaviors in the Rat. *Psychopharmacology* vol. 201 no. (1): pp. 115–123., doi:10.1007/s00213-008-1252-2.

- Merritt K, P McGuire, A Egerton (2013) Relationship between Glutamate Dysfunction and Symptoms and Cognitive Function in Psychosis. *Frontiers in Psychiatry* vol. 4 no. (NOV):, doi:10.3389/fpsy.2013.00151.
- Mevel LJC, Abitbol S, Beraud G ve ark. (1979) Temporal Changes in Plasma Adrenocorticotropin Concentration after Repeated Neurotropic Stress in Male and Female Rats. *Endocrinology* vol. 105 no. (3): pp. 812–817., doi:10.1210/endo-105-3-812.
- Miczek KA, Yap JJ, Covington HE (2008) Social Stress, Therapeutics and Drug Abuse: Preclinical Models of Escalated and Depressed Intake. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 120 no. (2): pp. 102–128., doi:10.1016/j.pharmthera.2008.07.006.
- Miller OH, Yang L, Wang CC ve ark. (2014) GluN2B-Containing NMDA Receptors Regulate Depression-like Behavior and Are Critical for the Rapid Antidepressant Actions of Ketamine. *ELife* vol. 3 October, doi:10.7554/eLife.03581.
- Mimee A, Smith PM, Ferguson AV (2012) Nesfatin-1 Influences the Excitability of Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract and Regulates Cardiovascular Function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 302 no. (11): pp. R1297–R1304., doi:10.1152/ajpregu.00266.2011.
- Miner JN, Yamamoto KR (1991) Regulatory Crosstalk at Composite Response Elements. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 16 January pp. 423–426., doi:10.1016/0968-0004(91)90168-U.
- Mitani F (2014) Functional Zonation of the Rat Adrenal Cortex: The Development and Maintenance. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* vol. 90 no. (5): pp. 163–183., doi:10.2183/pjab.90.163.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H ve ark. (1996) Distribution of Glucocorticoid Receptor Immunoreactivity and mRNA in the Rat Brain: An Immunohistochemical and in Situ Hybridization Study. *Neuroscience Research* vol. 26 no. (3): pp. 235–269., doi:10.1016/S0168-0102(96)01105-4.
- Morley JE, Levine AS (1982) Corticotrophin Releasing Factor, Grooming and Ingestive Behavior. *Life Sciences* vol. 31 no. (14): pp. 1459–1464., doi:10.1016/0024-3205(82)90007-8.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ (1984) Physiological Functions of Glucocorticoids in Stress and Their Relation to Pharmacological Actions. *Endocrine Reviews* vol. 5 no. (1): pp. 25–44., doi:10.1210/edrv-5-1-25.
- Murray Sherman S (2014) The Function of Metabotropic Glutamate Receptors in Thalamus and Cortex. *Neuroscientist* vol. 20 no. (2): pp. 136–149., doi:10.1177/1073858413478490.

- Myers B, Scheimann JR, Franco-Villanueva A ve ark. (2017) Ascending Mechanisms of Stress Integration: Implications for Brainstem Regulation of Neuroendocrine and Behavioral Stress Responses. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 74 March pp. 366–375., doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.011.
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL ve ark. (2011) Metabotropic Glutamate Receptors: From the Workbench to the Bedside. *Neuropharmacology*, doi:10.1016/j.neuropharm.2010.10.022.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 50 no. (1): pp. 295–322., doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
- Norris D, Carr J (2013) *Vertebrate Endocrinology: Fifth Edition* Vertebrate Endocrinology: Fifth Edition.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T ve ark. (2006a) Identification of Nesfatin-1 as a Satiety Molecule in the Hypothalamus. *Nature* vol. 443 no. (7112): pp. 709–712., doi:10.1038/nature05162.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R ve ark. (2010) Brain Development under Stress: Hypotheses of Glucocorticoid Actions Revisited. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* vol. 34 no. (6): pp. 853–866., doi:10.1016/j.neubiorev.2009.07.006.
- Okere B, Xu L, Roubos EW ve ark. (2010) Restraint Stress Alters the Secretory Activity of Neurons Co-Expressing Urocortin-1, Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript Peptide and Nesfatin-1 in the Mouse Edinger–Westphal Nucleus. *Brain Research* vol. 1317 March pp. 92–99., doi:10.1016/j.brainres.2009.12.053.
- Orth DN, Mount CD (1987) Specific High-Affinity Binding Protein for Human Corticotropin-Releasing Hormone in Normal Human Plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 143 no. (2): pp. 411–417., doi:10.1016/0006-291X(87)91369-6.
- Otto C, Reichardt HM, Schütz G (1997) Absence of Glucocorticoid Receptor- β in Mice. *Journal of Biological Chemistry* vol. 272 no. (42): pp. 26665–26668., doi:10.1074/jbc.272.42.26665.
- Owens MJ, Nemeroff CB (1991) Physiology and Pharmacology of Corticotropin-Releasing Factor. *Pharmacological Reviews* vol. 43 no. (4): pp. 425–473., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1775506>.
- Oyola MG, Handa RJ (2017) Hypothalamic–Pituitary–Adrenal and Hypothalamic–Pituitary–Gonadal Axes: Sex Differences in Regulation of Stress Responsivity. *Stress* vol. 20 no. (5): pp. 476–494., doi:10.1080/10253890.2017.1369523.

- Pałasz A, M Krzystanek, J Worthington ve ark. (2012) Nesfatin-1, a Unique Regulatory Neuropeptide of the Brain. *Neuropeptides* vol. 46 no. (3): pp. 105–112., doi:10.1016/j.npep.2011.12.002.
- Pan W, Hsueh H, Kastin AJ (2007) Nesfatin-1 Crosses the Blood–Brain Barrier without Saturation. *Peptides* vol. 28 no. (11): pp. 2223–2228., doi:10.1016/j.peptides.2007.09.005.
- Paxinos G, Watson C (2009) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
- Perez-Castro C, Renner U, Haedo MR ve ark. (2012) Cellular and Molecular Specificity of Pituitary Gland Physiology. *Physiological Reviews* vol. 92 no. (1): pp. 1–38., doi:10.1152/physrev.00003.2011.
- Perrin M, Donaldson C, Chen R ve ark. (1995) Identification of a Second Corticotropin-Releasing Factor Receptor Gene and Characterization of a cDNA Expressed in Heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 92 no. (7): pp. 2969–2973., doi:10.1073/pnas.92.7.2969.
- Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R ve ark. (1993) Cloning and Functional Expression of a Rat Brain Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor. *Endocrinology* vol. 133 no. (6): pp. 3058–3061., doi:10.1210/endo.133.6.8243338.
- Garcia-Pardo PM, de la Rubia JE, Asuncion Aguilar M (2017) The Influence of Social Stress on the Reinforcing Effect of Ecstasy under the Conditioned Place Preference Paradigm: The Role Played by Age, Dose and Type of Stress. *Revista De Neurologia* vol. 65 no. (10): pp. 469–476.
- Potter E, Sutton S, Donaldson C ve ark. (1994) Distribution of Corticotropin-Releasing Factor Receptor mRNA Expression in the Rat Brain and Pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 91 no. (19): pp. 8777–8781., doi:10.1073/pnas.91.19.8777.
- Price CJ, Hoyda TD, Samson WK ve ark. (2007) Nesfatin-1 Influences the Excitability of Paraventricular Nucleus Neurons. *Journal of Neuroendocrinology* vol. 20 no. (2): pp. 245–250., doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01641.x.
- Price Christopher J, Samson WK, Ferguson AV (2008) Nesfatin-1 Inhibits NPY Neurons in the Arcuate Nucleus. *Brain Research* vol. 1230 September pp. 99–106., doi:10.1016/j.brainres.2008.06.084.
- Primus R (1997) Autoradiographic Localization of CRF1 and CRF2 Binding Sites in Adult Rat Brain. *Neuropsychopharmacology* vol. 17 no. (5): pp. 308–316., doi:10.1016/S0893-133X(97)00071-7.
- Prinz P, Stengel A (2016) Expression and Regulation of Peripheral NUCB2/Nesfatin-1. *Current Opinion in Pharmacology* vol. 31 December pp. 25–30., doi:10.1016/j.coph.2016.08.012.

- Pujols L, Mullol J, Roca-Ferrer J ve ark. (2013) Expression of Glucocorticoid Receptor α - and β -Isoforms in Human Cells and Tissues. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* vol. 283 no. (4): pp. C1324–C1331., doi:10.1152/ajpcell.00363.2001.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE ve ark. (2010) Identification of Nesfatin-1 in Human and Murine Adipose Tissue: A Novel Depot-Specific Adipokine with Increased Levels in Obesity. *Endocrinology* vol. 151 no. (7): pp. 3169–3180., doi:10.1210/en.2009-1358.
- Ramesh N, Gawli K, Pasupuleti VK ve ark. (2017) Metabolic and Cardiovascular Actions of Nesfatin-1: Implications in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design* vol. 23 no. (10): pp. 1453–1464., doi:10.2174/1381612823666170130154407.
- Ratman D, van den Berghe W, L Dejager ve ark. (2013) How Glucocorticoid Receptors Modulate the Activity of Other Transcription Factors: A Scope beyond Tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology* vol. 380 no. (1–2): pp. 41–54., doi:10.1016/j.mce.2012.12.014.
- Reagan LP, Grillo CA, Piroli GG (2008) The As and Ds of Stress: Metabolic, Morphological and Behavioral Consequences. *European Journal of Pharmacology*, doi:10.1016/j.ejphar.2008.02.050.
- Reiner A, Levitz J (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* vol. 98 no. (6): pp. 1080–1098., doi:10.1016/j.neuron.2018.05.018.
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two Receptor Systems for Corticosterone in Rat Brain: Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology* vol. 117 no. (6): pp. 2505–2511., doi:10.1210/endo-117-6-2505.
- Reul JM, van den Bosch FR, de Kloet ER (1987) Relative Occupation of Type-I and Type-II Corticosteroid Receptors in Rat Brain Following Stress and Dexamethasone Treatment: Functional Implications. *Journal of Endocrinology* vol. 115 no. (3): pp. 459–467., doi:10.1677/joe.0.1150459.
- Rivier C, Vale W (1985) Effects of Corticotropin-Releasing Factor, Neurohypophyseal Peptides, and Catecholamines on Pituitary Function. *Federation Proceedings* vol. 44 no. (1 Pt 2): pp. 189–195., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2981740>.
- Rivier C, Rivest S (1991) Effect of Stress on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis: Peripheral and Central Mechanism and Central Mechanisms. vol. 45 pp. 523–532.
- Romero LM (2004) Physiological Stress in Ecology: Lessons from Biomedical Research. *Trends in Ecology and Evolution*, doi:10.1016/j.tree.2004.03.008.
- Rosenmund C (2003) Molecular Mechanisms of Active Zone Function. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 13 no. (5): pp. 509–519.,

doi:10.1016/j.conb.2003.09.011.

- Rosenthal MJ, Morley JE (1989) Corticotropin Releasing Factor (CRF) and Age-Related Differences in Behavior of Mice. *Neurobiology of Aging* vol. 10 no. (2): pp. 167–171., doi:10.1016/0197-4580(89)90026-2.
- Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J ve ark. (2001) Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity. *Toxicologic Pathology* vol. 29 no. (1): pp. 41–48., doi:10.1080/019262301301418847.
- Ross MH, Pawlina W (2011) Summary for Policymakers. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*, ed. Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 1–30, doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Sabatier N, Caquineau C, Dayanithi G ve ark. (2003) α -Melanocyte-Stimulating Hormone Stimulates Oxytocin Release from the Dendrites of Hypothalamic Neurons While Inhibiting Oxytocin Release from Their Terminals in the Neurohypophysis. *The Journal of Neuroscience* vol. 23 no. (32): pp. 10351–10358., doi:10.1523/JNEUROSCI.23-32-10351.2003.
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K (1987) Corticotropin Releasing Factor-like Immunoreactivity in the Rat Brain as Revealed by a Modified Cobalt-Glucose Oxidase-Diaminobenzidine Method. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 260 no. (2): pp. 256–298., doi:10.1002/cne.902600209.
- Salvatori AS, Elrick MM, Samson WK ve ark. (2014) Neuronostatin Inhibits Glucose-Stimulated Insulin Secretion via Direct Action on the Pancreatic α -Cell. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* vol. 306 no. (11): pp. E1257–E1263., doi:10.1152/ajpendo.00599.2013.
- Samson WK, Zhang JV, Avsian-Kretchmer O ve ark. (2008) Neuronostatin Encoded by the Somatostatin Gene Regulates Neuronal, Cardiovascular, and Metabolic Functions. *Journal of Biological Chemistry* vol. 283 no. (46): pp. 31949–31959., doi:10.1074/jbc.M804784200.
- Sapolsky RM (1999) Glucocorticoids, Stress, and Their Adverse Neurological Effects: Relevance to Aging. *Experimental Gerontology* vol. 34 no. (6): pp. 721–732., doi:10.1016/S0531-5565(99)00047-9.
- Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and Hippocampal Atrophy in Neuropsychiatric Disorders. *Archives of General Psychiatry* vol. 57 no. (10): p. 925., doi:10.1001/archpsyc.57.10.925.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*, doi:10.1210/er.21.1.55.
- Sassone-Corsi P, Christen Y (Eds.) (2016) *A Time for Metabolism and Hormones*, Cham: Springer International Publishing.

- Sattler R, Xiong Z, Lu WY ve ark. (2018) Distinct Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience* vol. 20 no. (1): pp. 22–33., doi:10.1523/jneurosci.20-01-00022.2000.
- Sawchenko PE (1987) Evidence for a Local Site of Action for Glucocorticoids in Inhibiting CRF and Vasopressin Expression in the Paraventricular Nucleus. *Brain Research* vol. 403 no. (2): pp. 213–224., doi:10.1016/0006-8993(87)90058-8.
- Sawchenko PE, Imaki T, Vale W (2007) Co-Localization of Neuroactive Substances in the Endocrine Hypothalamus., pp. 16–42, doi:10.1002/9780470514283.ch3.
- Schiller BJ, Chodankar R, Watson LC ve ark. (2014) Glucocorticoid Receptor Binds Half Sites as a Monomer and Regulates Specific Target Genes. *Genome Biology* vol. 15 no. (7): p. 418., doi:10.1186/s13059-014-0418-y.
- Schmidt TJ, Meyer AS (1994) Autoregulation of Corticosteroid Receptors. How, When, Where, and Why?. *Receptor*.
- Seasholtz AF, Burrows HL, Karolyi IJ ve ark. (2001) Mouse Models of Altered CRH-Binding Protein Expression. *Peptides* vol. 22 no. (5): pp. 743–751., doi:10.1016/S0196-9781(01)00387-4.
- Selye H (1936) A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents [13]. *Nature*, doi:10.1038/138032a0.
- Selye H (1950) Stress and the General Adaptation Syndrome. *British Medical Journal* vol. 1 no. (4667): pp. 1383–1392., doi:10.1136/bmj.1.4667.1383.
- Sharp PJ, Li Q, Talbot RT ve ark. (1995) Identification of Hypothalamic Nuclei Involved in Osmoregulation Using Fos Immunocytochemistry in the Domestic Hen (*Gallus Domesticus*), Ring Dove (*Streptopelia Risor*), Japanese Quail (*Coturnix Japonica*) and Zebra Finch (*Taenopygia Guttata*). *Cell & Tissue Research* vol. 282 no. (2): pp. 351–361., doi:10.1007/BF00319125.
- Sheng M, Kim E (2011) The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 3 no. (12):, doi:10.1101/cshperspect.a005678.
- Sherman JE, Kalin NH (1988) ICV-CRH Alters Stress-Induced Freezing Behavior without Affecting Pain Sensitivity. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* vol. 30 no. (4): pp. 801–807., doi:10.1016/0091-3057(88)90103-7.
- Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S ve ark. (2009) A New Anorexigenic Protein, Nesfatin-1. *Peptides* vol. 30 no. (5): pp. 995–998., doi:10.1016/j.peptides.2009.01.002.

- Shishkina GT, Bulygina VV, Dygalo NN (2015) Behavioral Effects of Glucocorticoids during the First Exposures to the Forced Swim Stress. *Psychopharmacology* vol. 232 no. (5): pp. 851–860., doi:10.1007/s00213-014-3718-8.
- Smith SM, Vale WW (2012) Autophagy Deficiency Contributes to Diabetes Progression. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 8 no. (2): pp. 68–68., doi:10.1038/nrendo.2011.222.
- Solomon MB, Furay AR, Jones K ve ark. (2012) Deletion of Forebrain Glucocorticoid Receptors Impairs Neuroendocrine Stress Responses and Induces Depression-like Behavior in Males but Not Females. *Neuroscience* vol. 203 pp. 135–143., doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.014.
- Solomon MB, Loftspring, AD De Kloet ve ark. (2015) Neuroendocrine Function after Hypothalamic Depletion of Glucocorticoid Receptors in Male and Female Mice. *Endocrinology* vol. 156 no. (8): pp. 2843–2853., doi:10.1210/en.2015-1276.
- Spencer RL, Deak T (2017) A Users Guide to HPA Axis Research. *Physiology and Behavior*, doi:10.1016/j.physbeh.2016.11.014.
- Spiga F, Liu Y, Aguilera G ve ark. (2011) Temporal Effect of Adrenocorticotrophic Hormone on Adrenal Glucocorticoid Steroidogenesis: Involvement of the Transducer of Regulated Cyclic AMP-Response Element-Binding Protein Activity. *Journal of Neuroendocrinology* vol. 23 no. (2): pp. 136–142., doi:10.1111/j.1365-2826.2010.02096.x.
- Stamp J, Herbert J(1999) Multiple Immediate-Early Gene Expression during Physiological and Endocrine Adaptation to Repeated Stress. *Neuroscience* vol. 94 no. (4): pp. 1313–1322., doi:10.1016/S0306-4522(99)00368-1.
- Stengel A (2015) Nesfatin-1 – More than a Food Intake Regulatory Peptide. *Peptides* vol. 72 October pp. 175–183., doi:10.1016/j.peptides.2015.06.002.
- Stengel A, Goebel-Stengel M, Jawien J ve ark. (2011) Lipopolysaccharide Increases Gastric and Circulating NUCB2/Nesfatin-1 Concentrations in Rats. *Peptides* vol. 32 no. (9);, Elsevier Inc. pp. 1942–1947., doi:10.1016/j.peptides.2011.07.006.
- Stengel A, Goebel M, Wang L ve ark. (2009) Central Nesfatin-1 Reduces Dark-Phase Food Intake and Gastric Emptying in Rats: Differential Role of Corticotropin-Releasing Factor2 Receptor. *Endocrinology* vol. 150 no. (11): pp. 4911–4919., doi:10.1210/en.2009-0578.
- Stengel A, Goebel M, Wang L ve ark. (2010a) Ghrelin, Des-Acyl Ghrelin and Nesfatin-1 in Gastric X/A-like Cells: Role as Regulators of Food Intake and Body Weight. *Peptides*, doi:10.1016/j.peptides.2009.11.019.
- Stengel A, Goebel M, Wang L ve ark. (2010b) Abdominal Surgery Activates Nesfatin-1 Immunoreactive Brain Nuclei in Rats. *Peptides* vol. 31 no. (2):

pp. 263–270., doi:10.1016/j.peptides.2009.11.015.

- Stengel A, Goebel M, Yakubov I ve ark. (2009) Identification and Characterization of Nesfatin-1 Immunoreactivity in Endocrine Cell Types of the Rat Gastric Oxyntic Mucosa. *Endocrinology* vol. 150 no. (1): pp. 232–238., doi:10.1210/en.2008-0747.
- Stengel A, Tache Y (2014) CRF and Urocortin Peptides as Modulators of Energy Balance and Feeding Behavior during Stress. *Frontiers in Neuroscience* vol. 8 no. (8 MAR):, doi:10.3389/fnins.2014.00052.
- Stephens MAC, PB Mahon, ME McCaul ve ark. (2016) Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Response to Acute Psychosocial Stress: Effects of Biological Sex and Circulating Sex Hormones. *Psychoneuroendocrinology* vol. 66 pp. 47–55., doi:10.1016/j.psyneuen.2015.12.021.
- Sternberg EM, Young WS, Bernardini R ve ark. (1989) A Central Nervous System Defect in Biosynthesis of Corticotropin-Releasing Hormone Is Associated with Susceptibility to Streptococcal Cell Wall-Induced Arthritis in Lewis Rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 86 no. (12): pp. 4771–4775., doi:10.1073/pnas.86.12.4771.
- Ströhle A (2003) Die Neuroendokrinologie von Stress Und Die Pathophysiologie Und Therapie von Depression Und Angst. *Der Nervenarzt* vol. 74 no. (3): pp. 279–292., doi:10.1007/s00115-002-1444-7.
- Suda T, Tozawa F, Yamada M ve ark. (1988) Insulin-Induced Hypoglycemia Increases Corticotropin- Releasing Factor Messenger Ribonucleic Acid Levels in Rat Hypothalamus*. *Endocrinology* vol. 123 no. (3): pp. 1371–1375., doi:10.1210/endo-123-3-1371.
- Swanson LW, PE Sawchenko (1980) Paraventricular Nucleus:A Site for the Integration of Neuroendocrine and Autonomic Mechanisms. *Neuroendocrinology* vol. 31 no. (6): pp. 410–417., doi:10.1159/000123111.
- Swanson LW, PE Sawchenko (1983) Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Annual Review of Neuroscience* vol. 6 no. (1): pp. 269–324., doi:10.1146/annurev.ne.06.030183.001413.
- Swanson LW, PE Sawchenko, J Rivier ve ark. (1983) Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study. *Neuroendocrinology* vol. 36 no. (3): pp. 156–186., doi:10.1159/000123454.
- Swerdlow NR, MA Geyer, WW Vale ve ark. (1986) Corticotropin-Releasing Factor Potentiates Acoustic Startle in Rats: Blockade by Chlordiazepoxide. *Psychopharmacology* vol. 88 no. (2): pp. 147–152., doi:10.1007/BF00652231.
- Timofeeva E, D Richard (1997) Functional Activation of Crh Neurons and Expression of the Genes Encoding Crh and Its Receptors in Food-Deprived

- Lean (Fa/?) And Obese (Fa/Fa) Zucker Rats. *Neuroendocrinology* vol. 66 no. (5): pp. 327–340., doi:10.1159/000127256.
- Timpl P, R Spanagel, I Sillaber ve ark. (1998) Impaired Stress Response and Reduced Anxiety in Mice Lacking a Functional Corticotropin-Releasing Hormone Receptor 1. *Nature Genetics* vol. 19 no. (2): pp. 162–166., doi:10.1038/520.
- Traynelis SF, LP Wollmuth, CJ McBain ve ark. (2010) Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews* vol. 62 no. (3): pp. 405–496., doi:10.1124/pr.109.002451.
- Ulrich-Lai YM, JP Herman (2009) Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 10 no. (6): pp. 397–409., doi:10.1038/nrn2647.
- Uth RM, JF McKelvy, RW Harrison ve ark. (1988) Demonstration of Glucocorticoid Receptor-like Immunoreactivity in Glucocorticoid-Sensitive Vasopressin and Corticotropin-Releasing Factor Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Journal of Neuroscience Research* vol. 19 no. (4): pp. 405–411., doi:10.1002/jnr.490190404.
- Vale W, J Spiess, C Rivier ve ark. (1981) Characterization of a 41-Residue Ovine Hypothalamic Peptide That Stimulates Secretion of Corticotropin and Beta-Endorphin. *Science* vol. 213 no. (4514): pp. 1394–1397., doi:10.1126/science.6267699.
- Vas S, C Ádori, K Könczöl ve ark. (2013) Nesfatin-1/NUCB2 as a Potential New Element of Sleep Regulation in Rats. *PLoS ONE* vol. 8 no. (4): p. e59809., doi:10.1371/journal.pone.0059809.
- Vaughan J, C Donaldson, J Bittencourt ve ark. (1995) Urocortin, a Mammalian Neuropeptide Related to Fish Urotensin I and to Corticotropin-Releasing Factor. *Nature* vol. 378 no. (6554): pp. 287–292., doi:10.1038/378287a0.
- Viau V, Meaney MJ (1991) Variations in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Stress during the Estrous Cycle in the Rat. *Endocrinology* vol. 129 no. (5): pp. 2503–2511., doi:10.1210/endo-129-5-2503.
- Viau V, PE Sawchenko (2002) Hypophysiotropic Neurons of the Paraventricular Nucleus Respond in Spatially, Temporally, and Phenotypically Differentiated Manners to Acute vs. Repeated Restraint Stress: Rapid Publication. *The Journal of Comparative Neurology* vol. 445 no. (4): pp. 293–307., doi:10.1002/cne.10178.
- Wamsteeker JJ, JS Bains (2010) A Synaptocentric View of the Neuroendocrine Response to Stress. *European Journal of Neuroscience* vol. 32 no. (12): pp. 2011–2021., doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07513.x.
- Watts AG (2005) Glucocorticoid Regulation of Peptide Genes in Neuroendocrine CRH Neurons: A Complexity beyond Negative Feedback. *Frontiers in*

- Neuroendocrinology vol. 26 no. (3–4): pp. 109–130., doi:10.1016/j.yfrne.2005.09.001.
- Williams TDM, Carter DA, Lightman SL (1985) Sexual Dimorphism in the Posterior Pituitary Response to Stress in the Rat*. Endocrinology vol. 116 no. (2): pp. 738–740., doi:10.1210/endo-116-2-738.
- Wotjak CT, M Kubota, G Liebsch ve ark. (1996) Release of Vasopressin within the Rat Paraventricular Nucleus in Response to Emotional Stress: A Novel Mechanism of Regulating Adrenocorticotrophic Hormone Secretion?. The Journal of Neuroscience vol. 16 no. (23): pp. 7725–7732., doi:10.1523/JNEUROSCI.16-23-07725.1996.
- Xie J, WJ Kuenzel, NB Anthony ve ark. (2010) Subpallial and Hypothalamic Areas Activated Following Sexual and Agonistic Encounters in Male Chickens. Physiology & Behavior vol. 101 no. (3): pp. 344–359., doi:10.1016/j.physbeh.2010.06.004.
- Xu L, B Bloem, B Gaszner ve ark. (2010) Stress-Related Changes in the Activity of Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript and Nesfatin Neurons in the Midbrain Non-Preganglionic Edinger–Westphal Nucleus in the Rat. Neuroscience vol. 170 no. (2): pp. 478–488., doi:10.1016/j.neuroscience.2010.07.001.
- Xu Y-Y, J-F Ge, G Qin ve ark. (2015) Acute, but Not Chronic, Stress Increased the Plasma Concentration and Hypothalamic MRNA Expression of NUCB2/Nesfatin-1 in Rats. Neuropeptides vol. 54 December pp. 47–53., doi:10.1016/j.npep.2015.08.003.
- Yadawa AK, CM Chaturvedi (2016) Expression of Stress Hormones AVP and CRH in the Hypothalamus of Mus Musculus Following Water and Food Deprivation. General and Comparative Endocrinology vol. 239 December pp. 13–20., doi:10.1016/j.ygcen.2016.03.005.
- Yang A, W Ge, S Lu ve ark. (2011) Central Administration of Neuronostatin Induces Antinociception in Mice. Peptides vol. 32 no. (9): pp. 1893–1901., doi:10.1016/j.peptides.2011.07.010.
- Yang B, Q Ren, M Ma ve ark. (2016) Antidepressant Effects of (+)-MK-801 and (-)-MK-801 in the Social Defeat Stress Model. International Journal of Neuropsychopharmacology vol. 19 no. (12): p. pyw080., doi:10.1093/ijnp/pyw080.
- Yin Y, Z Li, L Gao ve ark. (2015) AMPK-Dependent Modulation of Hepatic Lipid Metabolism by Nesfatin-1. Molecular and Cellular Endocrinology vol. 417 pp. 20–26., doi:10.1016/j.mce.2015.09.006.
- Yoshida N, Y Maejima, U Sedbazar ve ark. (2010) Stressor-Responsive Central Nesfatin-1 Activates Corticotropin-Releasing Hormone, Noradrenaline and Serotonin Neurons and Evokes Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. Aging vol. 2 no. (11): pp. 775–784., doi:10.18632/aging.100207.

- Yosten GLC, AT Pate, WK Samson (2011) Neuronostatin Acts in Brain to Biphasically Increase Mean Arterial Pressure through Sympatho-Activation Followed by Vasopressin Secretion: The Role of Melanocortin Receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 300 no. (5): pp. R1194–R1199., doi:10.1152/ajpregu.00849.2010.
- Yosten GLC, LJ Redlinger, WK Samson (2012) Evidence for an Interaction of Neuronostatin with the Orphan G Protein-Coupled Receptor, GPR107. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 303 no. (9): pp. R941–R949., doi:10.1152/ajpregu.00336.2012.
- Yosten GLC, WK Samson (2009) Nesfatin-1 Exerts Cardiovascular Actions in Brain: Possible Interaction with the Central Melanocortin System. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 297 no. (2): pp. R330–R336., doi:10.1152/ajpregu.90867.2008.
- Yosten GLC, WK Samson (2010a) The Anorexigenic and Hypertensive Effects of Nesfatin-1 Are Reversed by Pretreatment with an Oxytocin Receptor Antagonist. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* vol. 298 no. (6): pp. R1642–R1647., doi:10.1152/ajpregu.00804.2009.
- Yosten GLC, WK Samson (2010b) The Melanocortins, Not Oxytocin, Mediate the Anorexigenic and Antidipsogenic Effects of Neuronostatin. *Peptides* vol. 31 no. (9): pp. 1711–1714., doi:10.1016/j.peptides.2010.06.017.
- Zanos P, R Moaddel, PJ Morris ve ark. (2016) NMDAR Inhibition-Independent Antidepressant Actions of Ketamine Metabolites. *Nature* vol. 533 no. (7604): pp. 481–486., doi:10.1038/nature17998.
- Zhao J bing, Y Zhang, G zhao Li ve ark. (2011) Activation of JAK2/STAT Pathway in Cerebral Cortex after Experimental Traumatic Brain Injury of Rats. *Neuroscience Letters* vol. 498 no. (2): pp. 147–152., doi:10.1016/j.neulet.2011.05.001.
- Zhou Q, M-Y Xiao, RA Nicoll (2012) Contribution of Cytoskeleton to the Internalization of AMPA Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 98 no. (3): pp. 1261–1266., doi:10.1073/pnas.98.3.1261.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

3V: 3. Ventrikül
5-HT: 5-Hidroksitriptamin
ABC: Avidin-biyotin kompleks
ACTH: Adrenokortikotropik hormon
ADH: Anti-diüretik hormon
AgRP: Agouti-ilişkili peptit
Alfa-MSH: Alfa-melanosit uyarıcı hormon
AMPA: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit
AMPAR: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionik asit reseptörü
ARC: Arkuat nukleus
AVP: Vazopressin
BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Ca²⁺: Kalsiyum
CaMKII: Kalsiyum/ kalmodulin bağımlı protein kinaz II
cAMP: Siklik adenosin monofosfat
CART: Kokain and amfetamin-düzenleyici transkript
CNQX: 6-Siyano-7-nitrokuinoksalin-2,3-dion
CREB: Siklik AMP yanıt bağlayıcı protein
CRF, CRH: Kortikotropin salıverici faktör ya da hormon
CRF₁: Kortikotropin salıverici faktör₁
CRF-1: Kortikotropin salıverici faktör-1
CRF-2: Kortikotropin salıverici faktör-2
CRF_{2α}: Kortikotropin salıverici faktör_{2α}
CRF-41: Kortikotropin salıverici faktör-41
CRFR-1: Kortikotropin salıverici faktör-1
CRFR-2: Kortikotropin salıverici faktör-2
CRP: C-reaktif protein
CVMS: Değişken kronik hafif stres
DAB: 3'-Diaminobenzidine
DAG: Diaçil gliserol
DHEA: Dehidroepiandrosteron
DMV: Dorsal motor nukleus
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
ERK: Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
FSH: Folikül uyarıcı hormon
G.A.S.: Genel adaptasyon sendromu
GABA: Gama-Aminobütrik asit

GH: Büyüme hormonu
GHRH: Büyüme hormonu ilişkili hormon
GPR107: G-kapılı protein reseptörü 107
GR: Glukokortikoid reseptör
GRE: Glukokortikoid yanıt elemanı
GR α : Glukokortikoid reseptör alfa
GR β : Glukokortikoid reseptör beta
HADYEK: Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu
HPA: Hipotalamik-hipofizier-adrenal aks
IL-6: İnterlökin-6
IP3: İnositol 1-4-5-trifosfat
İcv: İntracerebroventriküler
iGluR: İyonotropik glutamat reseptörleri
ip: intraperitoneal
K⁺: Potasyum
KAR: Kainik asit reseptörleri
LC: Lokus koruleus
LH: Lüteinizan hormon
LHA: Lateral hipotalamik alan
LPS: Lipopolisakkarit
MC2R: Melanokortin reseptör-2
MCH: Melanin konsantre edici hormon
MR, MR: Mineralokortikoid reseptör
mGlu: Metabotropik glutamat
mGluR: Metabotropik glutamat reseptörleri
MK-801: N-methyl-D-aspartate reseptör antagonisti
MSH: Melanosit uyarıcı hormon
MSS: Merkezi sinir sistemi
NA: Noradrenalin
Na⁺: Sodyum
NaCl: Sodyum klorür
Ni-DAB: Nikel içeren 3'-Diaminobenzidine
NMDA: N-metil d aspartat
NMDAR: N-metil d aspartat reseptörü
NO: Nitrik oksit
NOS: Nitrik oksit sentaz
npEW: Edinger Westphal nukleus
NPY: Nöropeptit Y
NST: Nöronostatin
OT: oksitosin
PC2: Prohormon dönüştürücü enzim 2
PC3/1: Prohormon dönüştürücü enzim 3/1
PeN: Periventriküler nukleus
P-ERK1/2: Fosforile eksraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2
POMC: Proopiomelanokortin
PRL: Prolaktin
PVN: Paraventriküler nukleus
rRPa: Rostral raphe pallidus

SCN: Suprakiasmatik nukleus
SH-SY5Y: İnsan nöroblastoma hücre hattı
SON: Supraoptik nukleus
SPSS: Sosyal bilimler için istatistiksel paket program
SST: Somatostatin
StAR: Steroidojenik akut düzenleyici protein
TARP: Transmembran AMPAR-düzenleyici proteinler
TNF- α : Tümör nekroz faktör-alfa
TRH: Tirotropik hormon
TSH: Tiroid uyarıcı hormon
TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu
VLM: Ventro-lateral medulla
XOR: Oksidoredüktaz
Y-BOCS: Yale-Brown Obsesif Kompulsif Skala

8. EKLER

EK 1. Deney hayvanları etik kurul onayı

T.C. ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI						
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Farklı stres modellerinde nefsatin-1 ve norepinefrin nöronlarındaki aktivasyonun ve glutamaterjik sistem etkilerinin histolojik tekniklerle araştırılması				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR UU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD				
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Prof. Dr. F. Zehra MINBAY Doç. Dr. İlker M. KAFA Dokt. Öğr. Gulşin EKİZCELİ				
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Gulşin EKİZCELİ'nin Doktora Tez Projesi				
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	Eylül 2016 – Eylül 2018				
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	160 Adet Erkek – Dişi Sıçan				
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	TUBİTAK'a Başvurulacak				
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı		Tarihi			
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU		26.02.2016			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2016 - 04 / 05		Tarih : 01.03.2016			
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gereke, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sonucun araştırıcıya iletmesine oy birliğiyle kararı verildi. 1) Projele herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projele çalışacağı bilinen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlgili (*)	İmza		Düğünceler
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK Başkan	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H		Ret	
Prof. Dr. Levent BUYUKUYSAL Başkan Yardımcısı	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Erdoğan ŞENDEMİR Üye	Tıp - Anatomi	Tıp Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. M. Muht. KAHRAMAN Üye	Vet- Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Ayşe TOPAL Üye	Vet- Cerrahi	Veteriner Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ☒ H			
Prof. Dr. Sibel TAŞ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ☒ H			
Sema ÖZKAN Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Makine Mühendisi	☐ E ☒ H			
Yanar GÜLER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ziraat Yüksek Mühendisi	☐ E ☒ H			
Fanuk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	UU-DEHYUAM	☐ E ☒ H			

* Araştırma ile İlgili

9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgilerini ve zamanını esirgemeyen aynı zamanda tez çalışmamın her aşamasındaki desteklerinden dolayı danışmanım Sayın Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR'e,

Tez çalışmamın planlanmasından deney aşamasına kadar her konuda yardımını aldığım ve doktora eğitimim süresince bilgilerini, desteğini ve zamanını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Zehra MİNBAY'a,

Tez çalışmamın bir bölümünde laboratuvarını bana açan ve her ihtiyaç duyduğumda yardımcı olan Anatomi Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. M İlker Kafa'ya,

Eğitimim süresince bana destek olan aynı zamanda bilgi ve birikimlerini aktaran, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalındaki tüm hocalarıma,

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince hem her zaman manevi yanımda olarak destek olan hem de deneysel aşamalarda her zaman yardımına koşan çok değerli çalışma arkadaşlarım başta Kıymet Zülal HALK olmak üzere Ceren Oy ve Nursel HASANOĞLU AKBULUT'a,

Doktora tez çalışmamın bütçesinin tamamını destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkürlerimi sunarım.

Özel olarak da kendi hayatlarından fedakarlık yaparak her koşulda yanımda olan ve beni her zaman destekleyen sevgili eşim ve canım anneme,

Ve son olarak teşekkürü en çok hakeden en güzel zamanlarımızdan fedakarlık yaparak beni bekleyen, haftasonları ben laboratuvarında çalışırken benimle mesai yapan birtanecik oğlum Ege'ye herşey için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

10. ÖZGEÇMİŞ

Gülçin Ekizceli 1985 yılında Ankara’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara’da tamamladı. Lise eğitiminin ardından Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2010 yılında mezun oldu. Ardından Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimini “Ovulasyon ve İmplantasyon Dönemlerinde mTOR Yolağının Rolü” başlıklı tez çalışması ile 2013 yılında tamamladı. 2013 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında özel öğrenci olarak başladığı doktora eğitimine 2014 yılından beri doktora öğrencisi olarak devam etmektedir. Evli ve bir çocuk annesidir.

YAYINLARI:

A. Uluslar arası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI, SSCI, Arts and Humanities)

A1. Ekizceli G., Inan S., Oktem G., Onur E., Ozbilgin K., Assessment of mTOR pathway molecules during implantation in rats. *Biotech Histochem.* 2017; 92(6): 450-458. doi: 10.1080/10520295.2017.1350749. Epub 2017 Aug 31.

B. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

B1. Gülçin Ekizceli, Sevinç İnan, Gülperi Öktem, Ece Onur, Kemal Özbilgin. Sıçanlarda Östrus Döngüsü ile İlişkili Ovaryum ve Uterusların Histolojik Değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 41(2): 65-72, 2015.

B2. Gülçin Ekizceli, Sevinç İnan, Gülperi Öktem, Ece Onur, Kemal Özbilgin. Sıçan İmplantasyon Dönemi Boyunca Uterusların Histolojik Değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 41(3), 2015.

C. Uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

C1. Sevinc Inan, **Gulcin Ekizceli**, Ece Onur, Gulperi Oktem, Kemal Ozbilgin. The Role Of Mtor Pathway İn Ovulation And Implantation. 38th Federation Of European Biochemical Societies Congress, Febs Journal Volume: 280 Special Issue: S1 Supplement: 1 Pages: 410-411, Saint Petersburg, Russia Date: Jul 06-11, 2013.

C2. E. Turkoz Uluer, M Kivanc, Y. Sarica, **G. Ekizceli**, S. Inan. Evalution of Rapamycin Effects on MDA-MB 231 Breast Cancer Cell Line Using Immunohistochemistry and TUNEL Methods. Tissues, Pathology, and Diagnostic Microscopy, LS.2.P075; MC 2013. LS.2.P075, Regensburg, Germany, 25-30 August, 2013.

C3. **G. Ekizceli**, K. Z. HALK, I. M KAFA, Z. MINBAY, O. EYIGOR. Inflammatory Stress-Induced c-Fos Expression in the Nesfatin-1 Neurons in the Supraoptic Nucleus. 13th Göttingen Meeting, Göttingen, Germany 20-23 March 2019.

C4. O. Eyigor, **G. Ekizceli**, Z. Minbay. Nesfatin-1 Neurons Express Glucocorticoid Receptors in the Paraventricular and ARCuate Nuclei of the Hypothalamus. 13th Göttingen Meeting, Göttingen, Germany 20-23 March 2019.

C5. Z. Minbay, **G. Ekizceli**, K. Z. Halk, O. Eyigor. Nesfatin-1 Neurons Express c-Fos Following Restraint or Forced Swimming Stres. 13th Göttingen Meeting, Göttingen, Germany 20-23 March 2019.

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

D1. H. S. Vatansever, **G. Ekizceli**, K. Özbilgin. Kolon Kanseri Hücre Hattında TGF-β/SMAD Yolağı. Türk Elektron Mikroskopi Derneği, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Antalya 2011.

D2. **G. Ekizceli**, Y. Sarica, S. Inan, K. Özbilgin, M Sancı, V. Emirdar, S. Sayhan, C. E. Taner, M Özeren. Gebelik ile İlgili IUGG, Preeklampsi ve Gestasyonel Diabetes Mellitus'ta Göbek Kordonu ve Plasentada FOXP3, JAK1 ve STAT5 İmmünoreaktivitelerinin Değerlendirilmesi. Türk Histoloji Embriyoloji Derneği, 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Denizli 2012.

D3. B. C. Çavdarlı, N. Ekerbiçer, İ. Aksu, **G. Ekizceli**, C. Çetinkaya, S. Inan. Deneysel Diyabet Modelinde Kısa Süreli Statin Uygulamasının Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 38. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Trabzon 2012.

D4. M Sancı, V. Emirdar, S. Inan, F. Karaca, **G. Ekizceli**, Y. Sarica, S. Seyhan. mTOR Ve Erk Yolaklarının Uterus Düz Kas Tümörleri İle İlişkisi. Türk Jinekolojik Onkoloji Derneği, 13. Ulusal Jinekolojik Onkoloji Kongresi, Antalya 2012.

D5. G. Ekizceli, E. Onur, G. Öktem, K. Özbilgin, S. İnan. İmplantasyon Döneminde Mtor Yolağının Rolü. I. Sağlık Bilimleri Enstitüleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi Ve Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu, Çeşme 2013.

D6. E. T. Uluer, Y. Sarıca, M Kıvanç, **G. Ekizceli,** S. İnan. Mcf-7 Meme Kanseri Hücre Hattında Rapamycin Sitotoksitesinin İndirek İmmünohistokimyasal Ve Tunel Yöntemleri İle Değerlendirilmesi 21. Uluslar Arası Katılımlı Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28- 31 Mayıs, 2013. Mersin.

D7. G. Ekizceli, S. İnan. Sıçan Ovulatuvar Sürecinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi. II. Sağlık Bilimleri Enstitüleri Lisansüstü Öğrenci Kongresi ve Kök Hücre Sempozyumu, Kuşadası 2014.

D8. G. Ekizceli, G. Öktem, E. Onur, K. Özbilgin, S. İnan. İmplantasyon Dönemi Boyunca mTOR Yolağının Rolü. 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Ankara, 27-30 Mayıs 2014.

D9. G. Ekizceli, Y. Sarıca, M Sancı, V. Emirdar, C. E. Taner, M Özeren, S İnan. Gebelikle İlişkili Diabetes Mellitus, Pre-Eklampsi ve IUGG Olgularından Elde Edilen Plasenta Örneklerinde PI3K/AKT/mTOR Yolağının Değerlendirilmesi. 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Ankara, 27-30 Mayıs 2014.

D10. N. Ekerbiçer, N. U. Harzadın, B. C. Çavdarlı, **G. Ekizceli,** S. İnan. Diyabet Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Statin Uygulamasının Apoptozis Üzerine Etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Kayseri, 2-6 Eylül 2014.

D11. S. İnan, **G. Ekizceli,** K. Özbilgin. Tuba Uterina’da PI3K/AKT/mTOR Yolağı Moleküllerinin İmmünohistokimyasal Dağılımlarının Değerlendirilmesi Türk Elektron Mikroskopi Derneği, 22. Elektron Mikroskopi Kongresi, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, 1-4 Eylül 2015, EMK 2015.

D12. E. T. Uluer, M Özgül, O. Korkmaz, **G. Ekizceli,** S. İnan. Sıçan Uterusunda Aquaporin, VCAM, E-Cadherin ve Claudin Dağılımlarının İncelenmesi. Türk Elektron Mikroskopi Derneği, 22. Elektron Mikroskopi Kongresi, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, 1-4 Eylül 2015, EMK 2015.

D13. G. Ekizceli, Z. Minbay, Ö. Eyigör. Nesfatin-1 Nöronlarında Glukokortikoid Reseptör Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, 30 Nisan-3 Mayıs 2016.

GÖREV ALDIĞI PROJELER:

- S. İnan, E. Onur, K. Özbilgin, **G. Ekizceli.** Ovulasyon ve İmplantasyon Dönemlerinde MTOR Yolağının Rolü. MCBÜ BAP Projesi, 2011-2013. Proje No: 2011/038.

- N. Ekerbiçer, B. C. Çavdarlı, S. İnan, **G. Ekizceli.** Diyabetik Sıçanlarda Statin Uygulamasının Hemoreolojik Parametrelere ve Diyabetik Nefropati Üzerine Etkisi. MCBÜ BAP Projesi, 2012-2014.

- Ö. Eyigör, Z. Minbay, İ. M Kafa, K. Z. Halk, **G. Ekizceli**. 116S748 nolu TÜBİTAK 1001 Projesi, 2017-2019 (Bursiyer).

ÖDÜLLERİ:

- **G. Ekizceli**, G. Öktem, E. Onur, K. Özbilgin, S. İnan. Poster bildiri birincilik ödülü, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, 2014.

BİLİMSEL VE MESLEKİ KURULUŞLARA ÜYELİKLERİ:

- Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, <http://www.thed.org.tr>
- Türk Elektron Mikroskopi Derneği, <http://www.temd.org>
- Türkiye Sinirbilim Derneği, <http://www.tubas.org.tr>
- Federation of European Neuroscience Societies- <https://www.fens.org>

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Gülçin Ekizceli
Tez Adı	Farklı Stres Modellerinde Nesfatin-1 Ve Nöronostatin Nöronlarındaki Aktivasyonun Ve Glutamaterjik Sistem Etkilerinin Histolojik Tekniklerle Araştırılması
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı
Tez Türü	Doktora
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Özhan Eyigör
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni Kısıtlama	☐ Patent Kısıt (2 yıl) ☒ Genel Kısıt (6 ay) ☐ Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum.

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih:

İmza :