



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



NÖRONOSTATİN NÖRONLARI ÜZERİNDE  
GLUTAMATERJİK SİSTEM ETKİLERİNİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK  
ARAŞTIRILMASI

SEMA SERTER KOÇOĞLU

DOKTORA TEZİ

BURSA- 2017

SEMA SERTER  
KOÇOĞLU

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2017



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



**NÖRONOSTATİN NÖRONLARI ÜZERİNDE  
GLUTAMATERJİK SİSTEM ETKİLERİNİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**SEMA SERTER KOÇOĞLU**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:  
Prof. Dr. F. ZEHRA MİNBAY**

**BURSA-2017**

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

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum;

**“Nöronostatin Nöronları Üzerinde Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak 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.

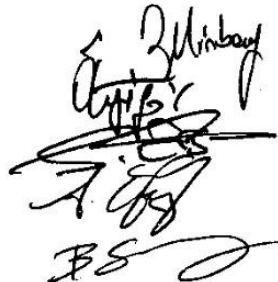
**Arş. Gör. Sema SERTER KOÇOĞLU**

**27.12.2016**



## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Sema Serter tarafından hazırlanan “Nöronostatin Nöronları Üzerinde Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması” konulu doktora tezi 06.01.2017 günü, 10.30-12.30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
<b>Tez Danışmanı</b>	Prof. Dr. F. Zehra Minbay	
Üye	Prof. Dr. Özhan Eyigör	
Üye	Prof. Dr. Semiha Ersoy	
Üye	Doç Dr. Alev Gürol Bayraktaroğlu	
Üye	Yar. Doç. Dr. 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

27/12/2016

**Adı Soyadı:** Sema SERTER KOÇOĞLU

**Anabilim Dalı:** Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Tez Konusu:** Çalışmamızın konusu; hipotalamusta pekçok nöroendokrin nöronun aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan ve eksitator aminoasit glutamatı nörotransmitter olarak kullanan glutamaterjik sistemin ve beslenme gibi periferik bir faktörün nörostatin nöronları üzerindeki etkilerinin gösterilmesidir.

ÖZELLİKLER	<u>UYGUN</u>		<u>ACIKLAMA</u>
	<u>UYGUNDUR</u>	<u>DEĞİLDİR</u>	
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Prof. Dr. F. Zehra MİNBAY

  
Prof. Dr. Zehra MİNBAY  
Uludağ Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD

## İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
TÜRKÇE ÖZET .....	VII
İNGİLİZCE ÖZET .....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. İnsanlarda Açlık ve Tokluk Hissi.....	5
2.2. İştahın Nöral Kontrolü ve Anatomisi .....	6
2.3. Besin Alımını Düzenleyici Sistemler.....	9
2.3.1. Santral Melanokortin Sistem.....	9
2.3.2. Santral Oksitosin Sistem.....	11
2.4. Besin Alımını Düzenleyen Peptitler .....	12
2.4.1. Oreksijenikler .....	13
2.4.2. Anoreksijenikler.....	16
2.5. Nöronostatin ve Nöronostatin Nöronları .....	20
2.5.1. Nöronostatin Peptidinin Moleküler Temeli.....	20
2.5.2. Nöronostatin Peptidinin Lokalizasyonu ve Etki Mekanizması .....	20
2.5.3. Nöronostatin Peptidi ve Hipotalamus İlişkisi .....	22
2.6. Glutamat ve Glutamaterjik Sistem.....	22
2.6.1. Glutamaterjik Sistem ve Hipotalamus .....	25
2.6.2. Glutamaterjik Sistem ve Besin Alımı .....	26
2.7. Nöronal Aktivasyon Belirteçleri.....	26
2.8. Glutamaterjik Sistem ve Nöronostatin Nöronları.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	29
3.1. Hayvan Materyali.....	29
3.2. Enjeksiyonların Yapılması, Dokuların Eldesi ve Saklanması.....	29
3.3. Kullanılan Antikorların Optimizasyonu .....	30
3.4. İmmünohistokimyasal Boyamaların Kontrolü.....	31
Santa Cruz Biotechnology, Inc. ....	31
Phoenix Pharmaceuticals, Inc .....	31
3.5. Deney Prosedürü .....	33
3.6. Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR .....	41
4.1. İmmünohistokimyasal Boyama Genel Sonuçları .....	41
4.2. Hipotalamusta Nöronostatin Nöronlarının Dağılımı .....	41
4.3. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Glutamaterjik Sistem Etkilerinin ve Aktivasyon Yolaklarının Araştırılması.....	44
4.3.1. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Agonist Kainik Asitin Etkisi .....	45

4.3.2. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Agonist AMPA'nın Etkisi	49
4.3.3. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Agonist NMDA'nın Etkisi	52
<b>4.4. Nöronostatin Nöronlarının Fizyolojik Olarak Uyarılması ve Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması.....</b>	<b>56</b>
4.4.1. Beslenme ile Uyarılan Nöronostatin Nöronlarında c-Fos Ekspresyonu..	57
4.4.2. Beslenme ile Uyarılan Nöronostatin Nöronlarında pSTAT5 Ekspresyonu .....	58
4.4.3. Beslenme ile Aktive Olan Nöronostatin Nöronlarında Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması.....	59
<b>4.5. Nöronostatin Nöronlarında Glutamat Reseptörlerinin Varlığı (GluK1-3 ve 5, GluA1-4, GluN1 ve GluN2A).....</b>	<b>61</b>
4.5.1. Nöronostatin Nöronlarında Kainik Asit Reseptör Alt Birimlerinin Varlığının İmmünofloresan Olarak Gösterilmesi (GluK1-3 ve GluK5) .....	61
4.5.2. Nöronostatin Nöronlarında AMPA Reseptör Alt Birimlerinin Varlığının İmmünofloresan Olarak Gösterilmesi (GluA1-4) .....	64
4.5.3. Nöronostatin Nöronlarında NMDA Reseptör Alt Birimlerinin Varlığının İmmünofloresan Olarak Gösterilmesi (GluN1 ve GluN2A).....	65
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>67</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>94</b>
<b>8. EKLER.....</b>	<b>96</b>
8.1. Şekil Listesi .....	96
8.2. Tablo Listesi.....	99
<b>9. TEŞEKKÜR.....</b>	<b>100</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>101</b>

## TÜRKÇE ÖZET

### “Nöronostatin Nöronları Üzerinde Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması”

Yeni tanımlanan bir peptit olan nöronostatin, intraserebroventriküler yolla verildiğinde besin alımını baskıladığı için anoreksijenik bir peptit olarak kabul edilmektedir. Nöronostatinin etki mekanizmaları çeşitli çalışmalar ile gösterilmiş olmasına karşın, nöronostatin nöronlarını kontrol eden mekanizmaları açıklayan çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamızda; hipotalamusta pek çok nöroendokrin nöronun aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan ve eksitatör amino asit glutamati nörotransmitter olarak kullanan glutamaterjik sistemin ve beslenme gibi periferik bir faktörün nöronostatin nöronları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda üç özgün hedef belirlenmiştir. Özgün hedef 1: Nöronostatin nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistem etkilerinin ve aktivasyon yollarının araştırıldığı deneyde, deneklere (n=10; 5 dişi+5 erkek) glutamat reseptör agonistleri (kainik asit, AMPA ve NMDA) veya %0,9 NaCl intraperitoneal yolla verilerek nöronostatin nöronlarında c-Fos, fosforile-CREB ve fosforile-STAT proteinlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Kainik asit uygulamasının sadece dişi deneklerde, AMPA ve NMDA uygulamalarının ise her iki cinsiyette de c-Fos eksprese eden nöronostatin nöronlarının sayısında istatistiksel anlamlı artışa neden olduğu gözlemlendi. Özgün hedef 2: Glutamaterjik sistemin nöronostatin nöronlarının fizyolojik uyarılması üzerindeki etkinliği araştırıldı. Bir grup denek 48 saat aç bırakılırken, ikinci grup 48 saat açlık sonrası ve üçüncü grup ise açlık süresinin bitiminde yapılan glutamat antagonisti (CNQX) uygulamasından 15 dakika sonra 2 saat süreyle beslendi. Beslenme ve açlık grupları arasında c-Fos eksprese eden nöronostatin nöronlarının sayısı açısından bir fark gözlenmezken, beslenmesinin her iki cinsiyette de nöronostatin-immünreaktif nöronlarda pSTAT5 ekspresyonunu arttırdığı ve CNQX uygulamasının bu artışı anlamlı olarak baskıladığı belirlendi. Özgün hedef 3 kapsamında ise nöronostatin nöronlarında glutamat reseptörlerinin varlığı ikili immünofloresans yöntemiyle araştırıldı. Nöronostatin nöronlarının NMDA ve non-NMDA reseptör alt birimlerini eksprese ettikleri gösterildi. Sonuç olarak, besin alımı ve glutamat agonistleri gibi periferik ya da merkezi sinyaller ile nöronostatin nöronlarının aktive olduğu ve bu aktivasyonda glutamaterjik sistemin etkin rol oynadığı düşünüldü.

**Anahtar Sözcükler:** Nöronostatin, glutamat, beslenme, açlık, c-Fos, pSTAT5.



## İNGİLİZCE ÖZET

### “Immunohistochemical Investigation of Glutamatergic System Effects on Neuronostatin Neurons”

Neuronostatin, a newly identified peptide, is accepted as an anorexigenic peptide since it suppresses food intake when intracerebroventricularly given. Although the effect mechanism of neuronostatin have been shown in different studies, there is no reports in the literature describing the mechanisms controlling neuronostatin neurons. Therefore, the purpose of the present study was to examine, the effects of feeding as a peripheral factor on neuronostatin neurons as well as the effects of the glutamatergic system, which uses glutamate as an excitatory amino acid neurotransmitter and plays a role in regulating the activity of many neuroendocrine neurons in the hypothalamus. Three specific aims were proposed: Specific aim 1: Expression of c-Fos, pCREB and pSTAT proteins in neuronostatin neurons were assessed in the experiment which investigated the activation pathways and glutamatergic system effects in regulating the neuronostatin neurons where the animals received intraperitoneal injections of glutamate receptor agonists (kainic acid, AMPA and NMDA) or 0.9% NaCl. A statistically significant increase was observed in the number of c-Fos-expressing neuronostatin neurons in both genders following AMPA and NMDA injections, and an increase was detected only in female subjects after kainic acid injection. Specific aim 2: The the effectiveness of the glutamatergic system on the physiological stimulation of neuronostatin neurons was investigated. While one group of subjects was fasted for 48 hours, the second group was fed for 2 hours after 48 hours fasting and the third group was fed for 2 hours after 15 minutes of glutamate antagonist (CNQX) injection at the end of fasting period. While there was no difference in the number of c-Fos-expressing neuronostatin neurons between the feeding and fasting groups, it was found that feeding increased pSTAT5 expression in neuronostatin-immunoreactive neurons in both genders and that CNQX injection significantly suppressed this increase. Specific aim 3: The presence of glutamate receptors in neuronostatin neurons was investigated by dual immunofluorescence method. The results showed that the neuronostatin neurons express most of the NMDA and non-NMDA receptor subunits. In conclusion, it was suggested that neuronostatin neurons were activated by peripheral or central signals including food intake and/or glutamatergic innervation, and the glutamate receptors play an important role in this activation.

**Key Words:** Neuronostatin, glutamate, feeding, fasting, c-Fos, pSTAT5.

## 1. GİRİŞ

Besin alımı, hormonal ve nöral sinyaller ile kontrol edilen, organizmanın canlılığını sürdürmesine yönelik kompleks bir mekanizmadır. Bu mekanizma merkezi sinir sistemi, sindirim sistemi ve yağ dokusunda eksprese edilen çok çeşitli nöropeptit ve nörotransmitter sistemlerin kontrolü altındadır. Hipotalamus, organizmanın temel işlevlerinin kontrolü ve homeostazisinde anahtar rol oynayan merkezi sinir sistemi bölümüdür. Son yıllarda hipotalamusta yer alan peptiderjik sistemlerin besin alımının kontrolündeki rolleri yoğun araştırma konusu olmuştur. Beyinde özellikle hipotalamusta eksprese edilen ya da etki gösteren enerji metabolizması ile besin alımını düzenleyen çok sayıda peptit belirlenmiştir. Bu çalışmanın konusu olan nöronostatin, hipotalamustaki lokalizasyonu ve besin alımını üzerinde etkisi yeni tanımlanan bir peptittir (Dun ve ark., 2010; Samson ve ark., 2008 ve Yosten ve Samson, 2010).

Nöronostatin (NST), somatostatin geni tarafından kodlanan 16 aminoasitli anoroksijenik bir peptittir (Samson ve ark., 2008). İmmünohistokimyasal çalışmalar, nöronostatin-pozitif nöron gövdelerinin hipotalamik anterior periventriküler ve suprakiazmatik nükleusta (SCN), nöronostatin-pozitif akson sonlanmalarının ise median eminens ile arkuat nükleusta belirgin olduğunu göstermiştir. Ayrıca; motor korteks, amigdala, beyincik ve dentat girusun polimorfik tabakasında daha az sayıda ve daha az yoğunlukta işaretlenmiş nöronostatin eksprese eden hücrelerin varlığı belirlenmiştir (Dun ve ark., 2010). Hipotalamusta nöronostatin nöronlarının ve nöronostatin-pozitif akson sonlanmalarının lokalize olduğu alanların besin alımının kontrolünde rol oynayan bölgeler olması ve intraventriküler nöronostatin uygulamasını takiben deneklerde su ve besin alımının azaldığının gösterilmesi, iştah ve metabolizmanın kontrolünde nöronostatinin rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Carlini ve ark., 2011; Samson ve ark., 2008; Su ve ark., 2012; Yosten ve Samson, 2010 ve Yosten, 2013).

Nöronostatinin periferik ve merkezi etkileri araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Amato ve ark., 2015; Elrich ve ark., 2016; Salvatori ve ark., 2014 ve Su ve ark., 2012). İntraserebroventriküler uygulanan nöronostatinin gastrik boşalmayı ve

gastrointestinal geçiş hızını doz-bağımlı geciktirmesi ve bu etkinin melanokortin-3/4 antagonisti veya klasik opioid reseptör antagonisti ile geri döndürülmesi, merkezi melanokortin sistemi ve opioid sistemin nöronostatinin gastrointestinal etkilerine aracılık ettiğini göstermektedir (Su ve ark., 2012). Farelerde intraperitoneal nöronostatin uygulamasının besin alımını doza bağımlı ve kısa süreli azalttığı, bu etkinin intramural sinir pleksusları aracılığıyla mide boşalma hızının ve intestinal geçiş hızının azalmasına bağılı olduğu düşünülmektedir (Amato ve ark., 2015). Nöronostatinin pankreas alfa hücrelerinde proglukagon mRNA seviyelerini anlamlı ölçüde arttırdığı ve düşük kan glukoz seviyesinin indüklediği glukagon salınımını arttırdığı, ayrıca pankreatik beta hücreleri üzerine direkt etki ederek glukoz ile uyarılan insülin salımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Salvatori ve ark., 2014). 2016 yılında nöronostatinin etkilerine aracılık eden G protein-bağılı reseptör olan GPR107 reseptörü ve sıçanda bu reseptörü eksprese eden dokular tanımlanmıştır (Elrich ve ark., 2016). GPR107 reseptörünün varlığı, periferde en yoğun olarak eksprese edildiği pankeas dışında, merkezi sinir sisteminde beyin sapı ve hipotalamusta PCR ile mRNA düzeyinde gösterilmiştir (Elrich ve ark., 2016). SHU9119 (melanokortin-3/4 reseptör antagonisti) nöronostatin ile indüklenmiş anoreksiyi geri döndürmesine karşın OVT'nin (oksitosin reseptör antagonisti) aynı etkiyi göstermemesi, nöronostatinin anoreksijenik ve antidipsijenik etkilerine, merkezi melanokortin sisteminin aracı olduğunu düşündürmüştür (Yosten ve Samson, 2010).

Peptiderjik nöronların aktivasyonunu düzenleyen üst sistemlerden biri olan glutamaterjik sistem, aminoasit yapılı glutamati nörotransmitter olarak kullanır. Nöronda sentezlenerek akson sonlarına taşınan ve buradan serbestlenen glutamat, hedef nöron ya da organlardaki reseptörlerine bağlanarak eksitatör etki gösterir. Glutamatın varlığı ve hedef nöron üzerindeki etkisini belirlemede, glutamatın aktive edici etkisi ve nörotransmisyonuna katılan bazı özgün molekülleri belirleyen tekniklerden yararlanır. Somada sentezlenen glutamat, sinaptik veziküller içinde toplanmasına aracılık eden ve glutamaterjik sisteme özgün moleküller olan veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) aracılığı ile akson sonlarına taşınır. VGLUT'lar özgünlükleri nedeniyle glutamati nörotransmitter olarak kullanan nöronların immünohistokimyasal işaretlemesinde spesifik belirteçler olarak kullanılırlar (Takamori, 2006). Ancak, immünohistokimyasal olarak sadece akson

sonlanmalarındaki butonlarda gösterilebilirler (Kaneko, 2002). Bu nedenle hedef nöron üzerindeki düğmeciklerde VGLUT'larının varlığının belirlenmesi, nöronun glutamaterjik innervasyon aldığına göstergesidir (Hisano ve Nogami, 2002). Yine hedef nöronda, glutamat etkisine aracılık eden glutamat reseptör alt birim proteinlerinin gösterilmesi glutamaterjik innervasyonun diğer bir göstergesidir. Ancak, reseptörlerin varlığı, reseptörlerin işlevselliği ile ilgili bilgi vermez. Bu nedenle, hedef nöronun glutamata verdiği yanıtın değerlendirilmesi gerekir. Bu amaçla deneklere, sadece glutamat reseptör alt birim agonistleri ve/veya agonist öncesi antagonistleri periferik ya da merkezi olarak uygulanır ve sonra nörondaki nöronal aktivasyon belirteçlerinin ekspresyonlarındaki değişiklikler immünohistokimyasal yöntemle belirlenir. Sadece agonist verilen deneklerde c-Fos, fosforile-CREB ya da fosforile-STAT'lar gibi aktivasyon belirteçlerinden birini eksprese eden nöronların sayısında anlamlı bir artış gözlenmesi ve artışın, agonistten 15 dakika önce uygulanan antagonist ile baskılanması, bu nöronların glutamaterjik innervasyon aldığını gösterir (Kondyli ve ark., 2010; Minbay ve ark., 2006 ve Varela ve ark., 2014).

Nöronostatinin etki mekanizmalarını açıklayan pek çok yayına karşın nöronostatin nöronlarının aktivasyonunun düzenleniminde rol oynayan periferik ve merkezi kontrol sistemleri hakkında literatür verisine raslanmamıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışması kapsamında “Nöronostatin nöronları beslenme ve glutamaterjik sistem tarafından aktive edilir ve beslenme ile gerçekleşen aktivasyonda glutamaterjik sistem rol oynar” hipotezi test edilmiştir. Bu hipotezi doğrulamak için belirlenen özgün hedefler aşağıdaki gibidir:

Özgün hedef 1: Nöronostatin nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistem etkilerinin ve aktivasyon yollarının araştırılması. Çalışmanın bu bölümünde, glutamat agonisti uygulanmış deneklerden elde edilen kesitlerde, nöronostatin nöronlarında nöronal aktivasyonda yer alan hücre içi yollar ve nöronal aktivasyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu amaçla, bu yollarda transkripsiyon faktörü olarak eksprese edilen ve nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanılabilen c-Fos, fosforile-CREB ya da fosforile-STAT proteinlerinin ekspresyonları glutamat agonistleri ile uyarılacağı düşünülen nöronostatin-pozitif nöronlarda araştırılmıştır.

Özgün hedef 2: Nöronostatin nöronlarının fizyolojik uyarılması ve glutamaterjik sistemin etkinliğinin araştırılması amacıyla, 48 saat aç bırakılmış denekler, açlık sonrası 2 saat beslenen denekler ve glutamat reseptör antagonistlerinin uygulanmasından 15 dk. sonra 2 saat süreyle beslenen deneklerden elde edilen beyin kesitlerinde nöronostatin nöronlarındaki aktivasyon immünohistokimyasal yöntemle belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, nöronal aktivasyon belirteçleri olarak yukarıda belirtilen proteinlerin ekspresyonları araştırılarak nöronal aktivasyon gösterilmeye çalışılmıştır.

Özgün hedef 3: Nöronostatin nöronlarında glutamat reseptörlerinin varlığının ikili immünofloresans işaretleme ile araştırılması. Bu amaçla ön uygulama yapılmamış deneklerde glutamat reseptör alt birimlerine ait proteinlerin nöronostatin nöronlarındaki ekspresyonları araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Hücrel işlevler ve organizmanın aktivitesi için gereken enerji, dışarıdan, beslenme yoluyla alınan ya da vücutta depolanan karbonhidrat, protein ve yağların metabolize edilmesi ile sağlanır. Besin alımı, günlük yaşamda aralıklı olarak gerçekleştirilen bir homeostaz mekanizmasıdır. Bu süreç, hipotalamus, sindirim sistemi ve yağ dokusunun birbirleri ile etkileşimiyle kontrol edilir. Üç sistem arasındaki iletişime nöronal sistemler (sempatik ve parasempatik sistem) ile çeşitli peptitler ve hormonlar aracılık eder (Crespo ve ark., 2014).

### 2.1. İnsanlarda Açlık ve Tokluk Hissi

Açlık ve iştah birbirinden farklı iki olgudur. Açlık, yiyecek yoksunluğunun neden olduğu rahatsız edici his olarak tanımlanır. İştah ise, açlık nedeniyle ya da spesifik yiyeceklere karşı hissedilen hoşlanma, haz alma duyularının neden olduğu artmış yemek yeme arzusudur (Sorensen ve ark., 2003).

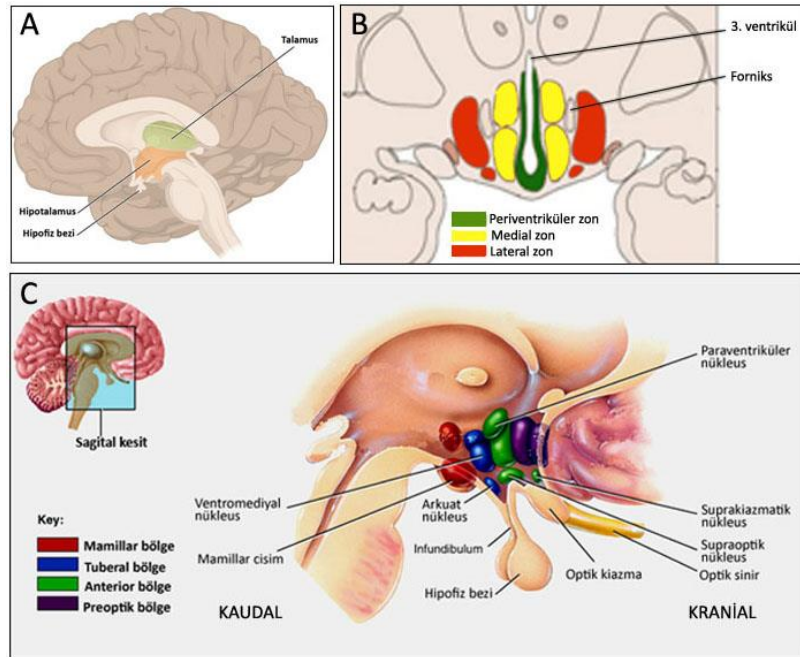
Tokluk, gıda alımının kesilmesinden sonra gelişen, açlık hissinin oluşumuna kadar geçen süreyi tanımlamaktadır. Tokluk sinyali yeterli besinin alınmasıyla oluşur. Doyma ise sadece besin alımının kesilmesidir (Sorensen ve ark., 2003).

Organizma enerji ihtiyacını öncelikle karbonhidratları yıkarak sağlar. Açlık durumunda glukoz alımının durmasına bağlı kan glukoz konsantrasyonunun düşmesi yağ dokusu, pankreas, karaciğer ve sindirim sistemi organlarından sinyal moleküllerinin salgılanmasına neden olur. Örneğin, pankreasın Langerhans adacıklarının  $\beta$  hücrelerinden insülin salınımı baskılanırken,  $\alpha$  hücrelerinden salınan glukagon seviyesi artar, sindirim sistemi mukozasında yerleşik enteroendokrin hücrelerden ghrelin adı verilen açlık sinyali kana salgılanır. Bu sinyaller, dolaşım sistemi aracılığıyla ve/veya nöronal sinyaller ile hipotalamusa ulaşarak besin alımını düzenleyen mekanizmaları uyarırlar (Crespo ve ark., 2014).

Gastrointestinal sistemde sindirilen besinlerin emilmesi de enteroendokrin hücrelerden doygunluk sinyallerinin salınmasına neden olur. Kan ve nöronal yollarla hipotalamusa ulaştırılan bu sinyaller, iştahı kapatan birçok maddenin salgılanmasını uyarır (Gunion ve ark., 1990).

## 2.2. İştahın Nöral Kontrolü ve Anatomisi

İştahın kontrol merkezleri beyinde hipotalamus ve beyin sapındaki soliter traktus nükleusudur (Yu ve Kim, 2012). Hipotalamus; talamusun aşağısında, hipofiz bezinin üstünde ve 3. ventrikülün çevresinde yerleşik, diensefalonun ventral yarısını oluşturan çok sayıda nöron topluluğu (nükleus) içeren beyin bölgesidir. Rostralde orta hatta optik kiyazma/anterior kommissür bölgesi ile kaudalde mamiller nükleusun posterior sınırına kadar olan bölgeyi içermektedir (Simerly, 2015). Hipotalamus mediolateral doğrultuda üç longitüdünel zona ayrılırken (periventriküler, medial ve lateral zonlar), kraniokaudal yönde preoptik, anterior (supraoptik), tuberal ve mamillar bölgeler olmak üzere dört farklı seviyede değerlendirilmektedir (Iversen ve ark., 2004 ve Toni ve ark., 2004) (Şekil 1).



Şekil 1. Hipotalamusun organizasyonu (Iversen ve ark., 2004). A: Hipotalamusun yerleşimi, B: Mediolateral doğrultuda hipotalamik zonlar, C: Kraniokaudal yönde hipotalamusun bölgeleri.

Hipotalamus, hipofizyal portal sistem yoluyla adenohipofiz ve somaları hipotalamik nükleuslarda bulunan nöronların aksonal uzantıları aracılığıyla da nörohipofiz ile bağlantılıdır. Hipotalamusun nörosekretuar hücreleri tarafından eksprese edilen, büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH), somatostatin, dopamin, kortikotropin-salgılatıcı hormon (CRH), gonadotropin-salgılatıcı hormon (GnRH) ve tiroid salgılatıcı hormon (TRH) gibi inhibitör ya da aktivatör faktörler

hipotalamusun median eminens bölgesindeki primer kapiller ağı boşaltılırlar. Portal venler kanı primer kapiller ağdan hipofiz bezinin pars distalis kısmındaki sekonder kapiller ağı iletilirler. Hipotalamusun paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerinde oksitosin ve vazopressin sentezleyen nöronların miyelinsiz aksonları, bu hormonları nörohipofize kadar taşırlar. Nörohipofizde Herring cisimlerinde depolanarak dolaşıma verilirler (Ross ve Pawlina, 2010).

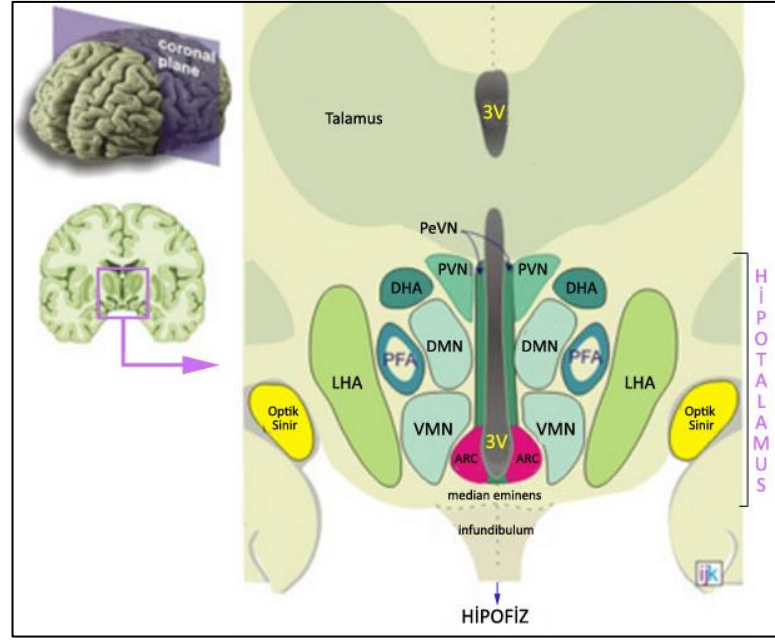
Hipotalamus; besin ve sıvı alımı, hipofiz bezi hormonlarının kontrolü, termoregülasyon, sıvı dengesi, kardiyovasküler fonksiyonlar, sirkadian ritim, uyku-uyanıklık siklüsü, immün regülasyon ve laktasyon gibi pekçok homeostatik mekanizmanın kontrol edildiği bölgedir (Segner ve ark., 2017 ve Toni ve ark., 2004).

Hipotalamus, adipoz doku ve sindirim sisteminden gelen periferik sinyalleri kan yoluyla direkt ya da beyin sapından gelen afferent nöronal yollar aracılığıyla indirekt olarak alır. Mekanoreseptörler ve kemoreseptörler tarafından uyarılan gastrointestinal vagal afferentler, sinyalleri soliter traktus nükleusuna ulaştırır, buradan da nöronlar aracılığıyla hipotalamusa taşınır (Crespo ve ark., 2014).

Hipotalamusun lateral zonu açlık merkezi, medial zonu ise tokluk merkezi olarak kabul edilmektedir (Stanley ve ark. 2005). Lateral zonda yerleşik lateral hipotalamik alan/perifornikal alan (LHA/PFA) ile medial zonda yerleşik arkuat nükleus (ARC), ventromedial nükleus (VMN), dorsomedial nükleus (DMN) ve paraventrikular nükleus (PVN) besin alımının kontrolünde rol oynayan ve birbirleriyle bağlantılı hipotalamik çekirdek yapılarıdır (Yu ve Kim, 2012) (Şekil 2).

Arkuat nükleus, kan-beyin bariyerinin tam olmadığı median eminens ve sirkümentriküler organ ile komşu hipotalamik alanıdır. Bu konumu nedeniyle kan yoluyla gelen periferik sinyaller (insülin, leptin, ghrelin gibi) ilk olarak ARC'ye ulaşır. Bu nedenle ARC besin alımının primer düzenleyici yapısı olarak kabul edilir (Cone ve ark., 2001). Ayrıca, 3. ventrikülün ventral duvarı ile komşuluğu nedeniyle, beyin-omurilik sıvısındaki hormon ve besinler ARC'nin ekstrasellüler ortamına difüze olabilirler.





**Şekil 2.** Besin alımının düzenlenimi ile ilgili hipotalamik çekirdekler. ARC, arkuat nükleus; DHA, dorsal hipotalamik alan; DMN, dorsomedial nükleus; LHA, lateral hipotalamik alan; PFA, perifornikal alan; PVN, paraventrikular nükleus; 3V, 3. ventrikül; VMN, ventromedial nükleus; PeVN, periventriküler nükleus. (<http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>. sitesindeki resimden modifiye edilmiştir. Erişim tarihi: 06.12.2016)

ARC’de birbirine ters çalışan iki tip nöron topluluğu bulunur (Cone ve ark., 2001). ARC’nin medialinde yerleşik olan nöron topluluğu oreksijenik nöropeptitler olan Agouti-ilişkili protein (AgRP) ve Nöropeptit Y (NPY) eksprese ederken (Broberger ve ark., 1998), daha lateralde yerleşik nöronlar ise besin alımını baskılayan Kokain- ve Amfetamin-İlişkili Transkript (CART) ve Pro-opiomelanokortin (POMC) sentezlerler (Kristensen ve ark., 1998). AgRP ve NPY nöronları, ipsilateral PVN ve ARC’nin POMC nöronlarına (Bai ve ark., 1985), CART ve POMC nöronları ise PVN’nin yanı sıra VMN, DMN ve LHA/PFA’ya uzantılarını gönderirler (Elias ve ark., 1998; Elmquist ve ark., 1998).

Besin alımının kontrolünde rol oynayan hipotalamik yapılardan bir diğeri olan PVN’de yerleşik nöronlar; CRH, somatostatin, vasopressin ve oksitosin gibi nöropeptitleri eksprese ederler. PVN’nin besin alımı ve kilo artışında inhibitör rol oynadığını gösteren deneysel çalışmalar bulunmaktadır. PVN’ye oreksijenik ya da anoreksijenik maddelerin enjeksiyonu ile beslenme alışkanlığının değiştiği gösterilmiştir (Shirasaka ve ark., 2001).  $\alpha$ -MSH agonistlerinin PVN’ye enjeksiyonunun besin alımını baskılayarak, antagonistlerinin uyardığı gösterilmiştir

(Giraud ve ark., 1998). Ayrıca, PVN'nin haraplanmasının hiperfaji ve obesiteye neden olduğu bildirilmiştir (Leibowitz ve ark., 1981).

VMN, özellikle ARC'den nöronal projeksiyonlar alırken; ARC, DMN, LHA ve beyin sapına nöronal uzantılar gönderir. VMN, glukoz ve leptine duyarlı nöronlar içermesi (Santiago ve ark., 2016), anoreksijenik bir peptit olan BDNF'nin (beyin-türevli nörotrafik faktör) üretildiği yer olması (Gotoh ve ark., 2013) ve hasarlanmasıyla hiperfaji, obesite ve hiperglisemi gibi patolojik durumların gelişmesi nedeniyle (Yu ve Kim, 2012), tokluk üreten ve glukoz homeostazını sürdüren çok önemli bir alan olarak kabul edilmektedir.

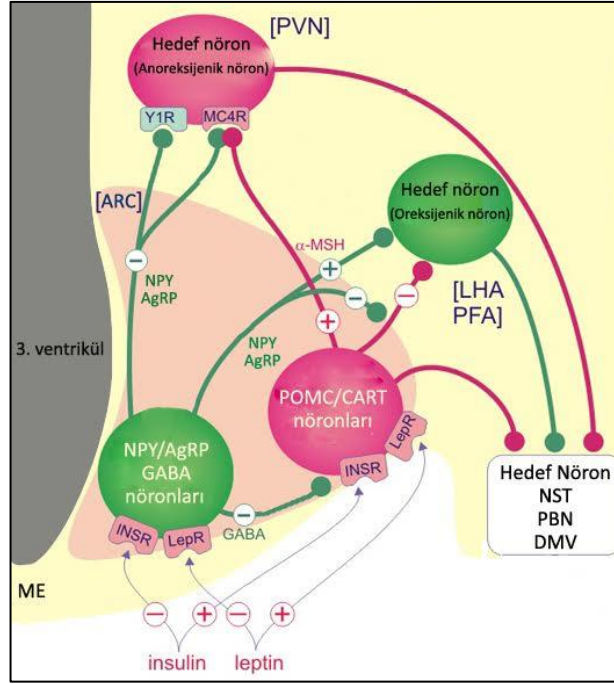
DMN'nin de enerji alımının düzenlenmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır. Elektrolitik metotla ve sinir kesileri ile oluşturulan DMN lezyonları, hiperfaji ve obesiteye neden olmaktadır (Bernardis ve ark., 1996; Bellinger ve Bernardis, 1999). Oreksijenik peptitlerin DMN'ye enjeksiyonları besin alımını arttırmaktadır (Stanley ve ark., 1985).

Hipotalamusun lateral bölgesi (LHA) ve perifornikal alan (PFA) üst merkezlerden gelen sinyallerle ilişkilidir ve hipotalamusun açlık merkezi olarak kabul edilirler (Stanley ve ark., 2005). LHA/PFA yerleşik nöronlarda oreksin ve MCH peptitlerini eksprese eden ve salgılayan nöronlar bulunmaktadır. Her iki peptit de oreksijenik etkiye sahiptir ve besin alımını arttırmaları (Chometton ve ark., 2016; Haemmerle ve ark., 2015 ve Nambu ve ark., 1999).

## **2.3. Besin Alımını Düzenleyici Sistemler**

### **2.3.1. Santral Melanokortin Sistem**

Santral melanokortin sistem, memeli santral sinir sisteminin farklı bölgelerinde lokalize nöron topluluklarından oluşur: (1) Hipotalamusun ARC'de lokalize NPY/AgRP ve POMC eksprese eden nöronlar, (2) Beyin sapında soliter traktus nükleusunun kommissural alanında lokalize olan ve POMC sentezleyip salgılayan nöronlar ve (3) POMC ve AgRP salgılayan nöronların hedefi olan ve melanokortin-3 (MC3R) ve melanokortin-4 reseptörlerini (MC4R) eksprese eden nöronlar (Cone, 2005 ve Cone, 2006) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Santral melanokortin sistem. NPY, nöropeptit Y; AgRP, agouti-ilişkili protein; GABA, gama-amino butirik asit;  $\alpha$ -MSH, alfa-melanosit stimüle edici hormon=melanokortin; LepR, leptin reseptörü; INSR, insulin reseptörü; Y1R, NPY reseptörü, MC4R, melanokortin-4 ( $\alpha$ -MSH) reseptörü. (<http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>. sitesindeki resimden modifiye edilmiştir. Erişim tarihi: 06.12.2016)

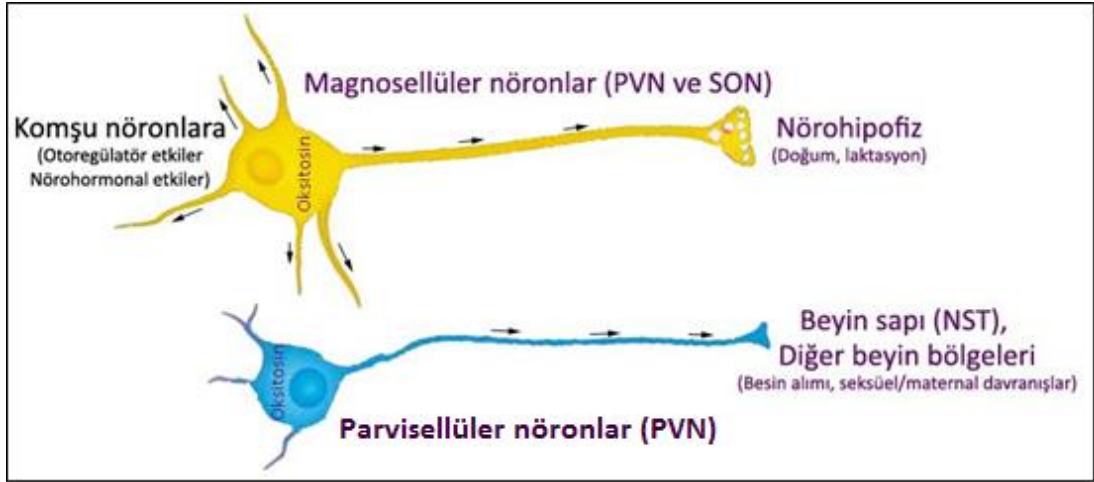
POMC nöronları tarafından eksprese edilen bir prohormon olan POMC, bazı enzimatik reaksiyonlar sonrasında  $\alpha$ -MSH gibi biyolojik aktif birkaç küçük peptide parçalanır.  $\alpha$ -MSH'in biyolojik etkilerine aracılık eden melanokortin reseptörlerinden MC3R ve MC4R'leri beyinde ve beyin sapında yaygın olarak eksprese edilirler. MC3R ve MC4R'leri eksprese eden hedef nöronlar; medial preoptik nükleus, median preoptik nükleus, PVN, anteroventral periventriküler hipotalamik nükleus, DMN (ventral kısmı hariç), ARC, soliter traktus nükleusu, vagusun dorsal motor nükleusu ve kaudoptamende lokalizedir (Kishi ve ark., 2003).

MC3R ve MC4R'lerinin iştah kontrolü ve enerji homeostazında oynadıkları rol, hayvan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir (Butler ve ark., 2000; Huszar ve ark., 1997 ve Lee ve ark., 2016). Farelerde MC3R'nin delesyonu, yağ kitlesinin artışı kolaylaştırırken (Butler ve ark., 2000), insanlarda bu genin mutasyonu obesiteye neden olabilmektedir (Lee ve ark., 2016). Kemirgenlerde MC4R'lerin yokluğunda, hiperfaji ve obesite gözlenmektedir (Huszar ve ark., 1997). MC3R/MC4R'lerinin endojen agonisti olan  $\alpha$ -MSH'nin intraserebroventriküler uygulaması besin alımını baskılayarak (Petervari ve ark., 2011) endojen

antagonistlerden biri olan AgRP'nin aynı yolla verilmesi besin alımını arttırmaktadır (Cone, 2005; Cone, 2006 ve Tracy ve ark., 2008).

### 2.3.2. Santral Oksitosin Sistemi

Oksitosin, hipotalamusta supraoptik (SON), paraventriküler (PVN) ve aksesuar çekirdeklerinden salınan ve dokuz aminoasitten oluşan peptid yapıları bir hormondur. Santral oksitosin sistemi, büyük oranda, hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan nöronlardan oluşmaktadır. Oksitosin üreten nöronlar, magnosellüler ve parvisellüler nöronlar olmak üzere 2 alt birimde incelenmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Santral oksitosin sistemi.

Supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerde bulunan magnosellüler nöronların aksonları ile nörohipofize (arka hipofize) bırakılan oksitosin genel dolaşıma verilmektedir. Ayrıca, magnosellüler oksitosin nöronlarının dendritleri aracılığıyla serbestledikleri oksitosin, komşu hücreler üzerinde hormonal etki göstermektedir. Dendrit aracılı serbestleşen oksitosinin bazı otheregülatör ve nörohormonal etkileri literatürde gösterilmiştir (Neumann, 2007 ve Sabatier ve ark., 2003).

Paraventriküler çekirdeklerde yerleşik parvisellellüler nöronlar ise beyin sapı ve diğer beyin bölümlerine uzantılarını göndererek; besin alımı, seksüel/maternal

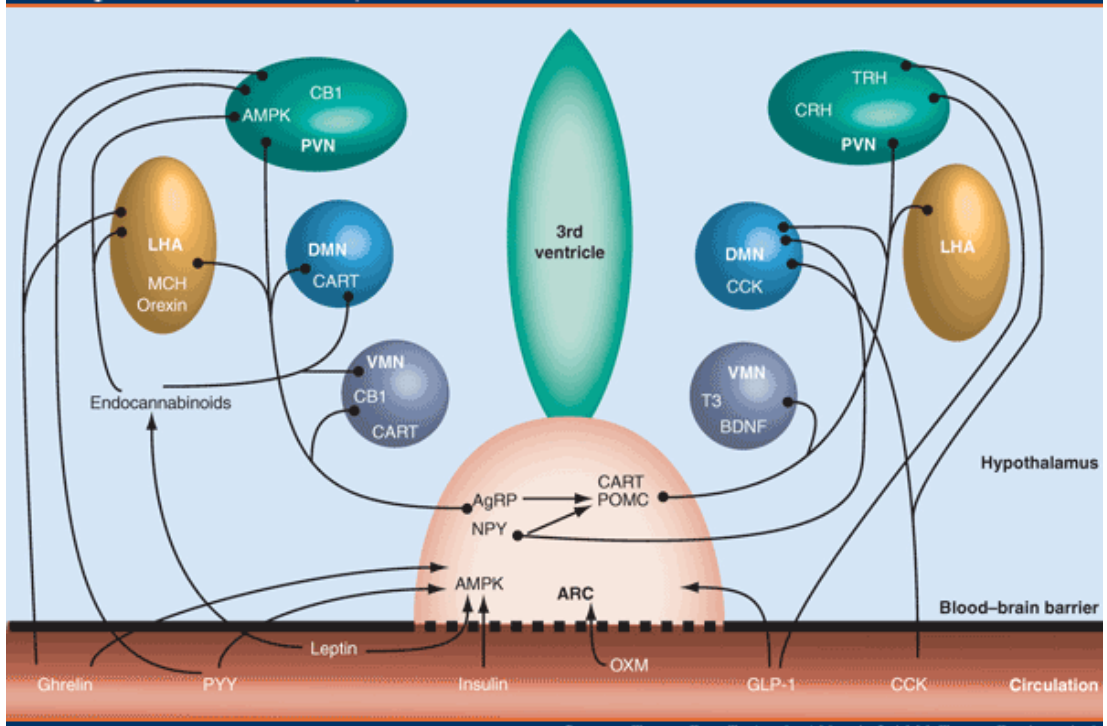
davranışlar ve kardiyovasküler sistemin kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar (Arletti ve ark., 1989; Kirchgessner ve ark., 1988 ve Michelini ve ark., 2003).

#### 2.4. Besin Alımını Düzenleyen Peptitler

Besin alımını düzenleyen peptitler, merkezi sinir sisteminin yanısıra, yağ dokusu ve sindirim sisteminde de sentezlenir ve salınırlar. Sindirim sisteminden 20'ye yakın peptit salgılanır. Bu peptitler hem sindirim sistemindeki ekzokrin bezlere ve düz kas dokusuna hem de periferik sinir sistemi üzerine etki ederler. Periferik organlarda sentezlenen peptitler, mide ve ince bağırsak motilitesi üzerine etki ederek gastrik distansiyonu ve bağırsaklarda geçiş zamanının uzamasıyla birlikte öğünler arasındaki tokluk hissini artırırlar. Bu peptitler periferik etkilerinin yanısıra merkezi sinir sistemi üzerine de etki ederler. Özellikle hipotalamustaki oreksijenik ve anoreksijenik sinyalleri etkileyerek besin alımını düzenleyici etki gösterirler (Sam ve ark., 2012) (Şekil 5). Besin alımı ile ilgili peptitler hem eksprese edildikleri sisteme hem de beslenme davranışı üzerindeki etkilerine göre sınıflandırılırlar. Eksprese edildikleri sisteme göre; merkezi sinir sisteminde üretilen merkezi peptitler ve sindirim kanalı ile yağ dokusunda üretilen periferik peptitler, beslenme davranışları üzerindeki etkilerine göre ise; oreksijenik ve anoreksijenik peptitler olarak gruplandırılırlar (Tablo 1).

**Tablo 1.** Besin alımı ve enerji homeostazi üzerine etkili peptitler.

Sentezlenip salındıkları lokasyona göre			
		Merkezi Peptitler	Periferik Peptitler
Etki mekanizmalarına göre	Oreksijenik peptitler	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nöropeptit Y (NPY)</li> <li>▪ Agouti-gen ilişkili protein (AgRP)</li> <li>▪ Melanin konsantre edici hormon (MCH)</li> <li>▪ Hipokretin/Oreksin</li> <li>▪ Galanin</li> <li>▪ Galanin-benzeri peptit</li> <li>▪ Serebellin1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ghrelin</li> </ul>
	Anoreksijenik peptitler	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Kokain ve amfetamin ilişkili transkript (CART)</li> <li>▪ <math>\alpha</math>-Melanosit uyarıcı hormon (<math>\alpha</math>-MSH)</li> <li>▪ Glukagon-benzeri peptitler (GLP1 ve GLP2)</li> <li>▪ Kortikotropin salgılatıcı faktör (CRF)</li> <li>▪ Nörotensin</li> <li>▪ Nesfatin</li> <li>▪ Nöronostatin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Leptin</li> <li>▪ Peptit tirozin tirozin (PYY)</li> <li>▪ Glukagon-benzeri peptit-1 (GLP-1)</li> <li>▪ Oksintomodülün (OXM)</li> <li>▪ Kolesistokinin (CCK)</li> <li>▪ Pankreatik polipeptit (PP)</li> <li>▪ Glukagon</li> <li>▪ İnsülin</li> <li>▪ Bombesin</li> <li>▪ Obestatin</li> </ul>



**Şekil 5.** Besin alımının düzenlenmesinde rol oynayan hipotalamik çekirdekler, peptitler ve yolaklar (Simpson ve ark., 2008). Dolaşımdaki hormonlar arkuat nükleustaki nöronları etkiler. ARC'deki oreksijenik nöronlar NPY ile AgRP ve anoreksijenik nöronlar ise POMC ile CART peptitlerini koeksprese eder. AgRP, Agouti-ilişkili protein; AMPK, Adenozin monofosfat protein kinaz; ARC, Arkuat nükleus; CART, Kokain- ve amfetamin-ilişkili transkript; CB1, Endokannabinoid reseptör 1; CCK, Kolesistokinin; DMN, Dorsomedial nükleus; GLP, Glukagon-benzeri peptit; LHA, Lateral hipotalamik alan; MCH, Melanin-konsantr eden hormon; NPY, Nöropeptit Y; OXM, Oksintomodulin; POMC, Pro-opiomelanokortin; PYY, Peptit YY; PVN, Paraventrikular nükleus; VMN, Ventromedial nükleus.

## 2.4.1. Oreksijenikler

### Oreksin

Oreksinler (hipokretinler), çoğunlukla lateral hipotalamus, perifornikal alan, dorsomedial hipotalamus ve posterior hipotalamik alanda yerleşik nöronlarca eksprese edilmektedir (Date ve ark., 1999; Nambu ve ark., 1999 ve Sakurai ve ark., 1998). Oreksin-immünoreaktif akson ve akson sonlanmalarının hipotalamus ve diğer beyin bölgelerindeki yaygın dağılımı Nambu ve ark. (1999) tarafından gösterilmiştir. Hipotalamusta yaygın bir dağılım göstermekle birlikte özellikle besin alımı ile ilişkili PVN ve ARC'de yoğun olarak izlenmektedir (Nambu ve ark., 1999).

Oreksin kelime olarak Yunanca '*orexis*' yani iştah kökünden gelmektedir. Hipotalamusta besin alımını stimüle etmektedir, oreksin-A ve oreksin-B olmak üzere 2 formu vardır (Sakurai ve ark., 1998). Oreksinler, oreksin-1 ve oreksin-2 reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Oreksin, oreksin-1 reseptörüne, oreksin-2'ye nazaran daha fazla bağlanma afinitesine sahiptir (Sakurai ve ark., 1998). Oreksin, besin alımı dışında, uyku düzeni ve kardiyovasküler fonksiyonlar üzerinde de

düzenleyici etkiye sahiptir (Koyama ve ark., 2003; Wang ve ark., 2003 ve Yamanaka ve ark., 2000).

## **Ghrelin**

Ghrelin 28 aminoasitten oluşan lipofilik yapıda bir peptittir. Başlıca, gastrik oksintik hücreler tarafından sentezlenir ve salınır (Date ve ark., 2000). Aynı zamanda; duodenum, jejunum, ileum ve kolonda da ghrelin pozitif hücreler bulunmaktadır. Bu peptidin, insan ve sıçanlarda pankreastan da salgılandığı gösterilmiştir (Date ve ark., 2002b). Ghrelinin merkezi sinir sisteminde de eksprese edildiği bilinmektedir. DMN, VMN ve PVN ile ARC arasındaki 3. ventriküle komşu hücreden fakir alanlarda ghrelin-pozitif nöronların varlığı saptanmıştır (Cowley ve ark., 2003). Bu nöronların NPY/AgRP, POMC ve CRH nöronları ile LHA'daki oreksin nöronlarına uzantılar göndermesi, homeostatik ve endokrin regülasyonda anahtar olan beyin bölgelerinin aktivitelerini senkronize edici rol oynadığını göstermektedir (Horvath ve ark., 2012). Ghrelin, periferde eksprese edilen tek açlık sinyalıdır. Ghrelin salınımının düzenlenmesinde en önemli faktör beslenmedir. Plazmadaki ghrelin konsantrasyonu açlıkla artarken beslenme sonrası azalmaktadır (Crespo ve ark., 2014 ve Sam ve ark., 2012).

Sıçanlarda vagal afferent nöronlar üzerindeki ghrelin reseptörlerinin varlığı, ghrelin sinyallerinin vagus siniri yoluyla mideden beyine iletildiğini düşündürmektedir (Date ve ark., 2002a). Ghrelin reseptörleri, iştah düzenlenmesi ile ilgili bir bölge olan hipotalamusun ARC'sinde bulunmaktadır. Ayrıca, periferik ghrelin uygulaması, ARC nöronlarında ve soliter traktus nükleusunda c-Fos ekspresyonunu uyarmaktadır (Hewson ve Dickson, 2000 ve Lawrence ve ark., 2002). İntraserebroventriküler ghrelin enjeksiyonu da besin alınımını arttırmakta ve enerji tüketimini azaltmaktadır (Kamegai ve ark., 2001).

### **Nöropeptit Y (NPY)**

Beyinde en çok bulunan nörotransmitterlerden biri olmasına karşın, birincil ekspresyon yeri hipotalamusun ARC'sidir. NPY nöronları uzantılarını DMN, PVN, LHA ve diğer hipotalamik alanlara gönderirler. Her ne kadar farklı fonksiyonlar ve davranış üzerine etkileri olsa da asıl etkisi beslenme üzerinedir ki bilinen en potent oreksijenik sinyallerden biri olarak kabul edilmektedir (Wisialowski ve ark., 2002). PVN'ye NPY salınması, leptin ve insülin gibi inhibitör ve glukokortikoid gibi stimülatör sinyaller ile düzenlenmektedir. İnsülin, NPY'nin sentezini ve PVN'ye salınımını inhibe etmektedir (Sato ve ark., 2005).

### **Melanin Konsantre Edici Hormon (MCH)**

Melanin konsantre edici hormon, 19 aminoasitli oreksijenik bir nöropeptittir. Özellikle LHA'da oldukça yüksek oranda eksprese edilmektedir (Chometton ve ark., 2016). MCH, oreksijenik etkilerini MCHR1 reseptörleri üzerinden göstermektedir. Bu reseptörler nükleus akkumbensin kabuk kısmında yoğun olarak bulunur (Haemmerle ve ark., 2015). Nükleus akkumbens, keyif (mood) ve ödül (reward) duygusuyla ilgili nöral sistemler ile ilişkilidir. Besinlerin hedonik ve çekici özellikleri beslenme davranışını etkileyen faktörlerdendir. Her iki sistem de besin alımının başlaması için gereklidir. Bu nedenle MCH'nin besin alımının non-homeostatik regülasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Haemmerle ve ark., 2015).

### **Agouti-İlişkili Protein (AgRP)**

AgRP, 132 aminoasitli bir peptittir. AgRP, yoğunlukla ARC'nin medial kısmında eksprese edilmekte ve AgRP mRNA'sı, NPY pozitif hücrelerin %95'inde NPY mRNA'sı ile birlikte lokalize olmaktadır (Broberger ve ark., 1998). AgRP, intraserebroventriküler olarak enjekte edildiğinde ya da direkt PVN veya DMN'ye verildiğinde oreksijenik etki gösteren bir peptittir (Kim ve ark., 2000). Ayrıca AgRP melanokortin-3 ve melanokortin-4 reseptörün endojen antagonistidir (Olmann ve ark., 1997). AgRP beslenme üzerinde modülatör bir rol oynamaktadır. NPY/AgRP



nöronları akson sonlanmalarından salgıladıkları GABA ile anoreksijenik nükleus bölgelerini inhibe ederek besin alımının artmasını sağlamaktadırlar (Sohn, 2015).

#### **2.4.2. Anoreksijenikler**

##### **Leptin**

İştahı baskıladığı ve enerji tüketimini regüle ettiği bilinen bir proteindir. Özellikle vücuttaki ana kaynağı adipoz doku olmakla birlikte mide ve hipofizde de eksprese edilmektedir (Huang ve ark., 2000). Leptin üretimi farklı moleküller tarafından kontrol edilir. Örneğin büyüme hormonu direkt olarak leptin gen ekspresyonunu düzenler. İnsülin ve kan şekeri leptin üretimini uyarırken; sempatik aktivite, lipolitik katekolaminler ve serbest yağ asitleri inhibe eder (Crespo ve ark., 2014). İnsanlarda 7. kromozom üzerinde bulunan obesite geni (ob geni) tarafından kodlanmaktadır. Görevi besin alımını ve enerji kaybı arasındaki dengeyi sağlamaktır (Friedman, 2010). Leptin, taşıyıcılar aracılığı ile kan beyin bariyerini aşarak ARC'de leptin reseptörü eksprese eden NPY/AgRP ve POMC/CART nöronları üzerinden anorektik etkisini gösterir. NPY/AgRP nöronlarını inhibe ederken, POMC/CART nöronlarını uyararak besin alımını azaltır (Crespo ve ark., 2014 ve Enriori ve ark., 2006) (Şekil 3).

##### **Kortikotropin Serbestleştirici Faktör (CRF)**

Kortikotropin serbestleştirici faktör, ACTH salınımını düzenleyici etkisi ile bilinen 41 aminoasitli bir peptittir. Beyinde ana ekspresyon yeri hipotalamusun paraventriküler nükleusunun parvisellüler nöronlarıdır. Emosyonel, regülatör ve katabolik pek çok etkisinin yanı sıra genetik olarak obez sıçanlarda vücut ağırlığının artmasını engellediği bildirilmektedir (Tenk ve ark., 2016). Beyin dışında, periferal organlarda da (karaciğer, akciğer, kalp, dalak, kan damarları, plasenta, testis, ovaryum) bulunmaktadır (Boorse ve Denver, 2006).

### **$\alpha$ -Melanosit Uyarıcı Hormon ( $\alpha$ -MSH)**

Melanokortin peptitlerinin (NPP,  $\gamma$ -MSH, ACTH,  $\alpha$ -MSH, CLIP,  $\beta$ -LPH,  $\gamma$ -LPH,  $\beta$ -MSH,  $\beta$ -Endorfin, Enkefalin) öncüsü pro-opiomelanokortin (POMC)'dir. POMC memelilerde, anterior ve intermediyet hipofiz, hipotalamus, deri ve immün sistemde eksprese edilmektedir. POMC nöronları sıçanlarda ARC'nin lateralinde yerleşiktir. Bazı enzimler ile dokularda  $\alpha$ -MSH'ye çevrilir ve MC3R ile MC4R'ni inhibe ederek besin alımını engeller (Anderson ve ark., 2016).

### **Kokain ve Amfetamin İlişkili (Regulated) Transkript (CART)**

CART ve CART peptitleri merkezi sinir sistemi (orta beyin, frontal korteks, amigdala, spinal kord, olfaktor bulbus), hipofiz, ve periferel dokularda (pankreas, gut ve adrenal bez) eksprese edilmektedir (Vicentic ve Jones, 2007). CART, fizyolojik süreçlerde önemli görevler üstlenmektedir. CART peptidinin intraserebroventriküler uygulaması besin alımını azaltmaktadır. CART özellikle, enerji homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen hipotalamik ARC, periventriküler nükleus, DMN ve PFA'da lokalizedir. CART diğer hipotalamik nöropeptitlerin salınımını da etkilemekte (Elias ve ark., 2001) ve arka beyinde besin alımını azaltmaktadır (Aja ve ark., 2001).

### **Bombesin**

Bombesin, Avrupa '*Bombina Bombina*' kurbağalarının derilerinden izole edilen bir tetradekapeptittir. Memelilerdeki homologları ise gastrin-salgılatıcı peptit (GRP) ve nöromedin-B'dir (Engster ve ark., 2016). Bombesin benzeri peptitler besin alımını takiben sindirim sisteminden salgılanırlar ve merkezi sinir sistemi ile sindirim sistemindeki reseptörlerine bağlanırlar (Moran ve ark., 1990). Merkezi sinir sistemindeki reseptörleri yaygın bir dağılım göstermektedir. En yoğun lokalizasyonun gözlendiği beyin bölgeleri arasında, hipotalamusun SCN ve periventriküler nükleusları ile soliter traktus nükleusu bulunmaktadır (Zarbin ve ark., 1985). Hipotalamus nükleusları ya da soliter traktus nükleusuna yapılan bombesin enjeksiyonundan sonra besin alımının baskılanması bu peptidin beslenme davranışındaki rolünü göstermektedir (Kyrkouli ve ark., 1987).

## **Kolesistokinin (CCK)**

Kolesistokinin, ince bağırsaktan post-prandial salınan anoreksijenik bir hormondur (Asin ve ark., 1992; de La Serre ve ark., 2016). Kolesistokinin CCK1 ve CCK2 reseptörlerine bağlanarak etkisini göstermektedir (Wang ve ark., 1992). Bu reseptörlerin hem periferde hem de merkezi sinir sisteminde eksprese edildikleri bilinmektedir (Wang ve ark., 1992). Merkezi sinir sisteminde dominant olarak eksprese edilen reseptör alt tipi CCK2 olmasına karşın, kolesistokinin besin alımı, tokluk ve enerji metabolizması üzerindeki etkilerini CCK1 reseptörleri aracılığı ile göstermektedir (Asin ve ark., 1992 ve Wang ve ark., 1992). CCK1 reseptörleri, besin alımı ile ilgili PVN ile DMN gibi hipotalamus bölgeleri, area postrema, vagusun dorsal motor çekirdeği ve NTS'de sonlanan vagal afferent nöronlarda eksprese edilmektedir (Moran ve ark., 1990).

## **İnsülin**

Besin alımını takiben pankreasın Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinden salınan insülin, dolaşım sistemi aracılığıyla hipotalamusa ulaşmakta ve hipotalamusta beslenmeyi düzenleyen merkezlerdeki (PVN, DMN, ARC) reseptörlerine bağlanmaktadır (Yu ve Kim, 2012). ARC'de yerleşik POMC/CART ve NPY/AgRP nöronlarındaki reseptörlerine bağlanan insülin, POMC nöronlarını aktive ederken NPY/AgRP nöronlarını ise inhibe etmektedir (Şekil 3). Böylece merkezi sinir sisteminde anoreksijenik sinyal olarak etki etmekte ve intraserebroventriküler yolla verildiğinde anoreksiye neden olmaktadır (Porte ve ark., 2005).

## **Glukagon**

Glukagon kan şekerinin düşmesiyle hızla artarak kan şekerini yükseltmektedir. Hipoglisemi, açlık, sempatik uyarılar ve glukokortikoidler, glukagon salımını tetiklemektedir. Pankreastaki  $\alpha$ -hücreleri, bağırsaktaki L-hücreleri ve soliter traktus nükleusunun nöronlarında, pre-proglukagon m-RNA düzeyinde eksprese

edilmektedir. Glukagon öncülü olan proglukagon pankreas alfa hücreleri, ileum ve kolonda L hücrelerinde üretilmektedir. Bileşenleri; glisentin, oksintomodulin (OXY), glukagon, glukagon-benzeri peptit 1 (GLP-1), glukagon-benzeri peptit 2 (GLP-2)'dir. Bağırsak kaynaklı inkretin hormonu olarak da tanımlanabilen GLP-1, GLP-2 ile birlikte yemek sonrası dolaşıma verilmektedir. GLP-1 aynı zamanda beyin sapında NTS'de küçük bir nöron popülasyonu tarafından sentezlenen bir nörotransmitterdir (Tang-Christensen ve ark., 2001). Besinlerin sindirimi, vagal afferentleri uyararak bağırsaklardaki L-hücrelerinden GLP-1 salınmasını tetikler (Torekov ve ark., 2011). GLP-2'nin intraperitoneal enjeksiyonunun besin alımını azalttığı gösterilmiştir (Janssen ve ark., 2013).

### **Nesfatin**

Nesfatin 2006 yılında endojen bir peptit olarak tanımlanmış (Oh ve ark., 2006) ve takip eden çalışmalarda bu yeni peptitin tokluğu indüklediği ve besin alımını güçlü bir şekilde engellediği gösterilmiştir (Stengel ve Tache, 2010). Etkileri dolayısıyla "tokluk molekülü" olarak da adlandırılan nesfatin, ilk defa hipotalamus ve NTS'de yerleşik nöronlarda belirlenmiştir (Oh ve ark., 2006).

Erkek sıçanlarda yapılan çalışmalarda bu molekülün intraserebroventriküler enjeksiyonunun yiyecek alımı ve vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (Oh ve ark., 2006). Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise, altı gün boyunca tekrarlayan periyotlardaki intraperitoneal yolla verilen nesfatin-1'in, besin alımını baskıladığı, vücut kütlelerinin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir (Shimizu ve ark., 2009). Deneklere nesfatin-1 antiserumu uygulandığında, kontrollere göre deneklerde besin alımı ve kilonun arttığı gözlemlenmiştir. Beslenme yetersizliğinde nesfatin-1'in serum seviyesinin giderek azaldığı, tekrar beslenmenin sağlanmasıyla nesfatin seviyesinin normale döndüğü bildirilmiştir. Nesfatinin periferik uygulanması sonrasında kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir (Pan ve ark., 2007). Sıçan beyninin 3. ventrikülüne nesfatin-1'in kronik infüzyonu sonucunda da, bu hayvanlardaki mezenterik beyaz adipoz dokuyu içeren adipoz kütlede azalma kaydedilmiştir (Oh ve ark., 2006). Bu sonuçlar, endojen nesfatin-1'in anoreksijenik düzenlenmeye aracılık ettiğini göstermektedir.

## **2.5. Nöronostatin ve Nöronostatin Nöronları**

### **2.5.1. Nöronostatin Peptidinin Moleküler Temeli**

Somatostatin (SST), hem nöroendokrin hem de enteroendokrin bir hormondur. Nöronal, nöroendokrin, gastrointestinal, inflamatuvar, immün sistem ve kanser hücrelerinde yaygın bir şekilde eksprese edilmekte ve nöromodülasyon, hormon salınımı, gastrointestinal fonksiyonlar, immün cevap, hücre gelişimi, ekzokrin salgı gibi çeşitli süreçlerde etkin rol oynamaktadır (Low, 2004).

Somatostatin pankreas delta hücreleri tarafından üretilir, beta ve alfa hücreleri tarafından üretilen insülin ve glukagon salınımını azaltır (Unger ve ark., 1978). Biyolojik sistemler üzerindeki inhibitör etkisini SSTR1-5 olarak adlandırılan G protein-bağlı beş adet reseptör aracılığı ile gösteren SST'nin preprohormonu 116 aminoasitten oluşur (Reisine ve Bell, 1995). Bu prekürsör, N-terminalde 24-aminoasitlik sinyal peptit ve C-terminalde iki SST formundan (SST-14 ve SST-28) meydana gelir. Bazı araştırmacılar, SST prekürsöründeki aminoasit dizisinin türler arasında çok iyi korunmuş olması ve hipotalamik sinir sonlanmalarında SST'ye eşlik eden maddelerin (processed fragments) varlığı nedeniyle SST geninin kodladığı fizyolojik olarak aktif ilave peptitlerin var olabileceğini düşünmüşlerdir (Goodman, 2003). Korunmuş dizilerin ve potansiyel bölünme alanlarının biyoinformatik analizleri sonucunda 2008 yılında "*nöronostatin*" adı verilen bir peptit tanımlanmış ve C-terminali amidasyona uğramış formunun biyolojik olarak aktif olduğu gösterilmiştir (Samson ve ark., 2008).

### **2.5.2. Nöronostatin Peptidinin Lokalizasyonu ve Etki Mekanizması**

Nöronostatinin hem periferel hem de merkezi sinir sistemindeki dağılımı SST ile benzerlik göstermektedir. Periferde; pankreas, kalp, dalak ve mide de, merkezi sinir sisteminde ise özellikle hipotalamik nöronlarda eksprese edilmektedir (Dun ve ark., 2010 ve Samson ve ark., 2008). Ancak, posttranslasyonel farklılıkları nedeniyle ekspresyon miktarları SST'ninkinden farklıdır (Samson ve ark., 2008).

Bu iki hormonun biyolojik aktiviteleri açısından da birbirlerinden farklı oldukları bilinmektedir. Şöyle ki; SST, ön hipofizden büyüme hormonu salınımını

inhibe ederken, nöronostatin, ne bazal ne de hormonla uyarılmış büyüme hormonu salınımını etkilememektedir (Samson ve ark., 2008). Nöronostatinin intraserebral enjeksiyonu, besin alımını inhibe edip, ortalama arteriyel basıncı artırırken (Samson ve ark., 2008), SST'nin bu iki olayda da tutarlı bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir (Stengel ve ark., 2010). SST, biyolojik etkilerini G protein-bağlı SSTR'leri üzerinden gösterir. Nöronostatinin bu reseptörlerden hiçbirini aktive etmediği bilinmektedir (Yosten, 2013). Dört farklı tip hücre için (hipotalamik nöronlar, kardiyomiyositler, pankreatik alfa hücreleri ve gastrik hücre line) spesifik sinyal oluşturan nöronostatin, etkisini G protein-bağlı reseptör olan GPR107 aracılığıyla protein kinaz A'yı fosforile ederek göstermektedir (Elrich ve ark., 2016). Nöronostatin, p38 mitojen-aktifleştirilen protein kinaz ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK)-bağımlı mekanizmalar aracılığıyla kardiyomiyosit canlılığı ve kalp fonksiyonları üzerinde de düzenleyici etkiye sahiptir (Hua ve ark., 2009).

Nöronostatin peptidinin merkezi ve periferal etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Samson ve ark. (2008), nöronostatinin merkezi sinir sistemine enjeksiyonunun besin ve su alımını baskımlarken ortalama arteriyel basıncı arttırdığını göstermişlerdir. Yine aynı grup, nöronostatinin kardiyomiyosit kasılmaları üzerinde baskılayıcı etki oluşturduğunu ve insan gastrik tümör hücre hattı olan KATOIII'de c-Fos ekspresyonunu arttırdığını ortaya çıkarmıştır (Samson ve ark., 2008). İntraperitoneal uygulanan nöronostatinin, pankreatik alfa hücrelerinde düşük-glukoz ile uyarılan glukagon artışına yol açtığı ve pankreatik beta hücrelerinde glukoz ile uyarılan insülin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Salvatori ve ark., 2014). Nöronostatinin intraserebroventriküler enjeksiyonunun, depresyon-benzeri etkiyi aktifleştirdiği ve bu etkisini melanokortin ile GABAerjik sistem üzerinden gösterdiği belirlenmiştir (Yang ve ark., 2011b). Nöronostatinin farelerde 6 nmol doz oranında analjezik (ağrı dindirici) etkisinin olduğu ve bu etkisini opioid ile melanokortin sistemler aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Yang ve ark., 2011a). Diğer bir çalışmada ise, nöronostatinin intraserebroventriküler uygulanmasının supraspinal sıvıda morfinin analjezik etkisini kuvvetlendirdiği ve opioid reseptörler aracılığıyla etki ettiği belirtilmiştir (Yang ve ark. 2013). Nöronostatinin, akut pankreas hasarlarında; interstisyel ödem, asiner hücre vakuolizasyonu, enflamatuvar inflamasyonu engellediği ve serum amilaz ile serum lipaz düzeylerini azaltarak

iyileştirici etki gösterdiği bildirilmiştir (Mo ve ark. 2013). Nöronostatin hafıza ve endişe ile ilgili merkezlerden biri olan hipokampus üzerine etki ederken, aynı fonksiyonlarla ilişkili diğer merkez olan amigdalaya etki etmemektedir. Ayrıca, nöronostatinin intraserebroventriküler uygulaması (en yüksek doz oranında) besin alımını azaltırken, intrahipokampal uygulamasının besin alımı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Carlini ve ark., 2011). Nöronostatinin intraserebroventriküler uygulaması ortalama arteriyel basıncı artıran vazopressinin plazma seviyesini yükseltmektedir (Yosten ve Samson, 2011).

### **2.5.3. Nöronostatin Peptidi ve Hipotalamus İlişkisi**

İmmünohistokimyasal çalışmalar, nöronostatin-pozitif nöronların anterior hipotalamik periventriküler çekirdek ve SCN'de, nöronostatin-immünoreaktif akson sonlanmalarının ise median eminens ile arkuat nükleusta belirgin olduğunu göstermiştir. Ayrıca, motor korteks, amigdala, beyincik ve dentat girusun polimorfik tabakasında daha az sayıda ve daha az yoğunlukta işaretlenmiş nöronostatin-pozitif hücrelerin varlığı belirlenmiştir (Dun ve ark., 2010). Hipotalamusta nöronostatin nöronlarının lokalize olduğu bu alanlar besin alımının kontrolünde rol oynayan bölgelerdir. Ayrıca, intraventriküler nöronostatin uygulamasını takiben su ve besin alımının azalttığının gösterilmesi (Carlini ve ark., 2011 ve Samson ve ark., 2008), nöronostatinin iştah ve metabolizmanın kontrolünde görev alabileceğini düşündürmektedir. Melanokortin-3/4 reseptör antagonisti olan SHU9119 ön uygulamasının, nöronostatinle indüklenmiş anoreksiyi ortadan kaldırması, bu peptidin merkezi etkilerini santral melanokortin sistemi aracılığıyla gösterdiğini düşündürmektedir (Yosten ve Samson, 2010).

### **2.6. Glutamat ve Glutamaterjik Sistem**

Glutamatın merkezi sinir sistemi üzerindeki eksitator etkisi 1950'li yılların ortalarında keşfedilmiştir. Farklı beyin bölgelerindeki yüksek konsantrasyonlardaki varlığı ve dağılımı belirlenmiş olmasına karşın, ancak 1980'lerin ortalarında nörotransmitter olabilme kriterlerini taşıdığı gösterilmiştir. Şöyle ki; fizyolojik uyarılmaya yanıt olarak presinaptik terminallerden  $Ca^{2+}$ -bağımlı ekzositoz ile

sinaptik aralığa salınan glutamat, postsinaptik membrandaki reseptörlerine bağlanıp etkisini gösterir göstermez hızla sinaptik aralıktan uzaklaştırılır (Fonnum, 1984; Kew ve Kemp, 2005; Meldrum, 2000 ve Wollmuth ve Sobolevsky, 2004 ).

Glutamat ve aspartat merkezi sinir sisteminde işlev gören major eksitatör aminoasit nörotransmitterlerdir (Brann, 1994; Brann, 1995; Kew ve Kemp, 2005; Meldrum, 2000 ve Wollmuth ve Sobolevsky, 2004). Glutamat, kan-beyin bariyerini aşamadığı için beyinde glukozdan sentezlenir. Glukozun yıkımıyla oluşan ve Krebs siklüsüne giren asetil-CoA'nın bir seri kimyasal reaksiyon sonucu dönüştüğü  $\alpha$ -ketoglutaratın transaminasyonu ile glutamat sentezlenebildiği gibi, doğrudan glutaminden de üretilebilir (Squire ve ark., 2008)

Glutamat aracılı nörotransmisyon; G-protein kapılı metabotropik ve iyon kanalı oluşturan iyonotropik glutamat reseptörleri üzerinden gerçekleşir (Kubo ve Ito, 2004 ve Kew ve Kemp, 2005). Presinaptik nörondan salınan glutamatın, postsinaptik membrandaki iyonotropik reseptörlerinde oluşturduğu konformasyon değişikliği sonucu açılan transmembran iyon kanalları, desensitizasyon ya da glutamatın deaktivasyonu ile spontan olarak kapanır (Kubo ve Ito, 2004). İyonotropik glutamat reseptörleri, hızlı eksitatör postsinaptik potansiyel oluşturarak nöronal depolarizasyon yaparken, metabotropik reseptörler, nörotransmisyonda modülatör olarak fonksiyon yapmaktadır (Koles ve ark., 2001).

İyonotropik glutamat reseptörleri, agonistlerine göre sınıflandırılır: N-metil-D-aspartat (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazolpropionik asit (AMPA) ve 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin (kainat) reseptörleri (Kew ve Kemp, 2005; Lerma ve ark., 2001 ve Tse ve Yung, 2000).

NMDA reseptörleri (GluN) yeni nomenklatüre göre GluN1, GluN2A-D ve GluN3A-B olarak isimlendirilen alt birimlerden oluşur (Collingridge ve ark., 2009 ve Koles ve ark, 2001). Bu reseptörler, eksitatör sinaptik transmisyon, plastisite ve nörotoksisite olaylarında kritik öneme sahiptir (Cull-Candy ve ark., 2001; Mayer, 2016; Ozawa ve ark., 1998; Paoletti, 2011 ve Pachernegg ve ark., 2012). NMDA reseptörlerinin birbirinden çok farklı bu süreçlerde yer alabilmelerinin nedeni, AMPA ve kainat reseptörlerinden farklı karakteristik özellikler taşımalarıdır: Aktive olabilmeleri için glutamat dışında başka bir agonist, glisin ya da D-serin gereklidir.



Ekstrasellüler  $Mg^{2+}$  iyonları ile voltaj-bağımlı bloklanabilirler. Kalsiyum iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterirler. Özellikle yavaş aktivasyon-deaktivasyon kinetikleri sergilerler. Aktiviteleri, merkezi sinir sisteminde endojen olarak bulunan çeşitli allosterik modülatörlere bağlıdır (Cull-Candy ve ark., 2001; Mayer, 2016 ve Paoletti, 2011).

Glutamat/aspartat (glutamat, aspartat göre NMDA reseptörlerini daha güçlü stimüle eder) ve glisin NMDA reseptörlerinin potent agonistleridir. Dizocilpine (MK-801), ketamin, xenon, dexanabinol ve agmatin ise NMDA reseptör antagonistleridir (Feigenbaum ve ark., 1989; Fix ve ark., 1993; Kohrs ve Durieux, 1998; Weigt ve ark., 2009 ve Yang ve Reis, 1999). NMDA reseptör alt birimleri homomerik reseptör kanalları oluşturamazlar. GluN1, fonksiyonel NMDA reseptörlerinin oluşabilmesi için varlığı zorunlu alt birimdir. NMDA reseptörleri, iki GluN1 ve iki GluN2 alt biriminden oluşur: GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B gibi. Ayrıca, GluN1 ve GluN2 alt birimleri, triheteromerik NMDA reseptörleri de meydana getirebilirler. GluN3 alt birimi ise ya GluN1 ile diheteromerik (GluN1/GluN3) ya da GluN1 ve GluN2 ile birlikte triheteromerik (GluN1/GluN2/GluN3) reseptörler oluşturur. Bu reseptör komplekslerinin, farmakolojik ve biyofiziksel (geçirgenlik ve kapı oluşturma özellikleri) özellikleri, allosterik modülatörler ile antagonistlere duyarlılıkları yapılarındaki alt birimlerin kompozisyonuna göre değişiklik gösterir. Dolayısıyla, reseptörlerin alt birim kompozisyonu NMDA reseptörlerinin fonksiyonel özelliklerini de belirler (Cull-Candy ve ark., 2001; Mayer, 2016; Paoletti, 2011 ve Pachernegg ve ark., 2012).

AMPA reseptörleri (GluA); GluA1, GluA2, GluA3 ve GluA4 alt birimlerinden oluşan homomerik ya da heteromerik konfigürasyondaki (GluA1/GluA2, GluA2/GluA3 gibi) reseptörlerdir (Mayer, 2016). Quisqualate, AMPA, glutamat ve kainat, AMPA reseptör alt birimlerinin potent agonistleridir. AMPA reseptörlerinin potent antagonisti Quinoxalinedione'lar (DNQX ve CNQX), kainat reseptörlerini de bloklar (Petralia ve Wenthold, 1996).

1990'lı yılların başında klonlanan kainat reseptör grubunda (GluK) beş alt birim bulunmaktadır: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 ve GluK5 (Lomeli ve ark., 1992). Bu beş alt birim, yapısal benzerlik ve [ $^3H$ ] kainat affinitesine göre iki gruba

ayrılır (Bleakman ve ark., 2002 ve Pinheiro ve Mülle, 2006): GluK1-3 düşük afiniteli kainat reseptör alt birimleri olup %75-80 oranında yapısal benzerlik gösterirler. Yüksek affiniteli grubu oluşturan GluK4 ve GluK5, %68 yapısal benzerlik gösterir. İki grup arasındaki benzerlik oranı ise %45'dir (Conti ve ark., 2002). GluK1-3, tek başına homomerik kanal yapısı oluşturabilirken, GluK4 ve GluK5, yalnızca diğer alt birimlerle (GluK1-3) birlikte eksprese edildiklerinde kanal oluşturabilirler (Frerking ve Nicoll, 2000 ve Lerma ve ark., 2001). Kainat reseptörleri diğer iyonotropik reseptörlerden farklı olarak, sıklıkla aynı nöronda olmak üzere, presinaptik ve postsinaptik lokalizasyonlara sahiptir (Kamiya, 2002).

Gerek homomerik gerekse heteromerik kainat reseptörleri; kainat, quisqualate ve glutamata yanıt verirken quinoxalinedione'lar ile inhibe edilirler. Ancak, AMPA reseptörleri ile kıyaslandığında yanıtları daha düşüktür (Petralia ve Wenthold, 1996). AMPA ve kainat reseptörleri  $Na^{+}$ 'un, bazı reseptörlerinde ise  $Ca^{2+}$ 'un hücre içine alınması ve  $K^{+}$ 'un dışarı verilmesi ile transmisyonu sağlarlar ve merkezi sinir sisteminde hızlı eksitator transmisyonundan sorumludur (Bigge, 1999). Presinaptik kainat reseptörleri ise, transmitter salınımını (glutamat ve diğer transmitterler) düzenler (Isaac ve ark., 2004).

### **2.6.1. Glutamaterjik Sistem ve Hipotalamus**

Pek çok homeostatik mekanizmanın düzenlenmesinde kontrol merkezi işlevi gören hipotalamik nöronlar; üst merkezlerden, periferden ve hipotalamusun başka bölgelerinden gelen sinyaller ile regüle edilirler. Bu sinyaller; nörotransmitterler (aspartat, glutamat, GABA, asetilkolin, katekolaminler), nöropeptitler (substans P, somatostatin, galanin, nörotensin vb.) ve çeşitli nöromodülatör maddeler (endojen benzodiazepinler, prostoglandin vb.) aracılığıyla hipotalamik nöronlarda inhibitör ya da eksitator stimuluslar oluştururlar (Brown ve Wilkinson, 1994).

Çeşitli ultrastrüktürel ve immünohistokimyasal çalışmalar ile SCN, VMN, ARC, PVN ve SON gibi hipotalamik çekirdeklerin nöronları üzerindeki presinaptik butonlarda glutamat immünopozitifliği gösterilmiştir (Goldsmith ve ark., 1994; Van den Pol, 1991 ve Van den Pol ve ark., 1990).

## 2.6.2. Glutamaterjik Sistem ve Besin Alımı

Glutamatın açlık merkezi olarak kabul edilen LHA'daki akson terminallerinde lokalize olduğu ve LHA nöronlarının bazı glutamat reseptör alt birimlerini eksprese ettiği gösterilmiştir (Van den Pol ve Trombley, 1993). Lateral hipotalamusa yapılan glutamat enjeksiyonlarının, beslenme cevabında kısa süreli bir gecikmeye neden olduğu belirlenmiştir (Stanley ve ark., 1993b). NMDA, AMPA ve kainat ligantlarının her birinin LHA'ya enjeksiyonu, besin alımında glutamat ve reseptörlerinin doza bağımlı etkinliğini ortaya çıkarmıştır (Stanley ve ark., 1993a). Aynı zamanda lateral LHA'ya NMDA reseptör antagonistinin enjeksiyonu açlıkla uyarılan beslenmeyi baskılamıştır (Hettes ve ark., 2003). İntrahipotalamik ve nöroendokrin sinyallerin yanı sıra arkuat nükleustan direkt ve indirekt sinyalleri alan LHA'da oluşan lezyonlar, besin alımı, vücut ağırlığı ve glutamat reseptör stimülasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Dorsal vagal kompleksde primer eksitator nörotransmitter olan glutamat; soliter traktus nükleus nöronları, glial hücreler, diğer beyin bölümlerinden gelen afferent sinyaller ve vagal afferent sonlanmalardan salınmaktadır (Davis ve ark., 2004; Hermann ve ark., 2009 ve Peters ve ark., 2008). Arka beyne uygulanan NMDA reseptör antagonistinin, tokluğu geciktirerek besin alımını arttırdığı ve CCK ile besin alımının baskılanmasını engellediği ortaya konmuştur (Campos ve ark., 2012). NTS'de besin alımının azalmasının MC4R aktivasyonuna ve takiben NMDA reseptörlerini içeren (NR2A/B) PKA-bağımlı mekanizma ile sağlandığı gösterilmiştir (Campos ve Ritter, 2015). Bütün bu bulgular beslenmenin düzenlenmesinde glutamatın önemli bir düzenleyici olduğunu ve bu sürece NMDA ve AMPA/kainat reseptörlerinin aracılık ettiğini göstermektedir.

## 2.7. Nöronal Aktivasyon Belirteçleri

Nöronal aktivite değişikliklerini belirlemede c-Fos, pSTAT (fosforile sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri) ve pCREB (fosforile c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri belirteç olarak kullanılmaktadır (Hoffman ve Lyo, 2002).

**a. c-Fos:** 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 immünoaktivitesi, uyarımı takip eden 60-90 dakika içerisinde belirlenebilmektedir (Eriksson ve ark., 1996).

**b. CREB:** Diğer bir transkripsiyon faktörü olan CREB'in (c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein) nöronal ve sinaptik plastisite, nöronal koruma, nörogenezde nöronal öncüllerin proliferasyonu ve sağkalımı, nöronların büyümesi gibi süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (Carlezon ve ark., 2005 ve Mayr ve Montminy, 2001). CREB'in aktifleşebilmesi için, cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) tarafından fosforillenmesi gerekir. Fosforilasyon sonucu oluşan pCREB çekirdekte genlerin özgün sentezini başlatarak birçok hücrel cevabın ortaya çıkmasına neden olur. pCREB varlığı, hormonal ve metabolik sinyallerin gösterilmesinde (Altarejos ve Montminy, 2011), glutamat gibi nörotransmitterlerin etkilerinin belirlenmesinde (Balazs, 2006) aktivasyon belirteci olarak kullanılmaktadır.

**c. STAT:** STAT (sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri) proteinleri, transkripsiyonu aktive eden sinyal molekülleridir. İnaktif olarak sitoplazmada yer alırlar ve etkinleşince çekirdeğe geçerler. STAT proteinlerinin aktivasyonu için de aminoasit rezidülerinin fosforilasyonu gereklidir. Fosforilasyon sürecinde, reseptör-bağımlı JAK tirozin kinaz sistemi görev alır. Fosforile-STAT (pSTAT) hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edeceği çekirdeğe geçerek DNA molekülüne bağlanır ve gen aktivasyonunu başlatır (Bromberg ve Darnell, 2000). Çekirdekte belirlenen pSTAT immünoaktivitesi, o nöronun transkripsiyonel aktivasyona başladığını, yani aktive olduğunu 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 immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi, hem nörondaki aktivite değişiklikleri ve aktivasyon yollarını hem de nöronun fenotipi hakkında bilgi verir.

## **2.8. Glutamaterjik Sistem ve Nöronostatin Nöronları**

Besin alımı birçok nörotransmitter ve nöropeptit sistemlerin kontrolü altındadır. Hipotalamusun farklı çekirdeklerinde lokalize olan peptitlerin besin alımının kontrolündeki rolleri yoğun çalışma konusudur. Bu peptitlerden biri olan nöronostatin de hipotalamusta anterior periventriküler çekirdekte lokalize nöronlar tarafından eksprese edilen, besin ve su alımı, enerji tüketimi, kardiyovasküler sistem, pankreas ve mide sistemleri üzerinde düzenleyici etkilere sahip, yeni tanımlanan bir peptittir. Nöronostatin nöronlarının hedef hücre ve organlardaki etkilerine dair literatür bilgisi olmasına karşın, nöronostatin nöronlarının kontrolünde yer alan merkezi (nörotransmitter ve nöropeptit gibi) ve periferal (beslenme gibi) düzenleyicilerin araştırıldığı deneysel çalışmalara rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak tez çalışmasında, hipotalamusun birçok endokrin ve peptiderjik sistemi üzerinde eksitatör etkisiye sahip aminoasit nörotransmitter glutamatın, hipotalamusun anterior periventriküler çekirdeğinde yerleşik nöronostatin nöronlarının aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayıp oynamadığı araştırıldı.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmada, Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından sağlanan Sprague Dawley cinsi 200-250 g ağırlığında dişi ve erkek sıçanlar Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun izni ile kullanıldı (26.02.2016 tarihli 2016-4/4 karar no).

#### 3.2. Enjeksiyonların Yapılması, Dokuların Eldesi ve Saklanması

Glutamat agonist ve antagonistleri deneklere intraperitoneal enjeksiyon yolu ile verildi. Enjeksiyon işlemlerinden 90 dakika sonra denekler derin eter anestezisi altında transkardiyak perfüzyon ile sakrifiye edildi. Deneklerin dolaşım sistemleri %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra, perfüzyon fiksasyon işlemi Sorenson'un fosfat tamponunda<sup>1</sup> hazırlanmış %4'lük paraformaldehit<sup>2</sup> solüsyonu ile gerçekleştirildi. Çıkarılan beyinler %4'lük paraformaldehit içine alınarak tüm gece +4°C'de postfiksasyona bırakıldı. Vibratom ile hipotalamusun rostra-kaudal eksenini boyunca 40 µm kalınlığında 5 seri halinde beyin kesitleri alındı. Alınan beyin kesitleri Tris-HCl tamponu<sup>3</sup> (0,05 M) ile 3 kez yıkandıktan sonra kullanım zamanına kadar kriyoprotektan<sup>4</sup> madde içinde -20°C'de saklandı.

---

<sup>1</sup> **Sorenson'un Fosfat Tamponunun Hazırlanışı.** Solüsyon A [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (0.13 M), (Merck)] 46.54 g/lt, Solüsyon B [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.13 M), (Merck)] 17.68 g/lt. pH 7,4 oluncaya kadar solüsyon A üzerine solüsyon B eklendi.

<sup>2</sup> **%4 Paraformaldehit Hazırlanışı.** 100 ml distile suda 40 g paraformaldehit (Merck, Cat. No: 104005) magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı üzerinde 58°C'ye kadar ısıtılarak çözülür. Sıcaklık kesildikten sonra solüsyon berraklaşmaya kadar 1 N NaOH (Merck) ilave edilir, filtre kağıdından süzülür. Filtrat 0,13 M fosfat tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır. Konsantre hidroklorik asit ya da 1 N NaOH ile son pH 7.4'e ayarlanır.

<sup>3</sup> **Tris Tamponu (0.05 M) Hazırlanışı.** Trizma base (Merck, Cat. No: 108387) 6 g/1000 ml distile su. Konsantre hidroklorik asit ile pH 7.6'ya ayarlanır.

<sup>4</sup> **Kriyoprotektan Hazırlanışı.** 0.05 M Tris tamponu (500 ml), sükröz (BDH, Prod. No: 302997) (300 g), etilen glikol (BDH, Prod. No: 282966) (300 ml) ve polivinilprolidon (Amresco, Cat. No: 1512B22) (10 g). Maddeler verilen sıraya göre eklenir. Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır.

### 3.3. Kullanılan Antikorların Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan primer antikorlar (Tablo 2) için en uygun dilüsyon, inkübasyon süresi ile inkübasyon sıcaklığı ve ön uygulamaların (antijen retrieval işlemi, endojen peroksidaz aktivitesinin bloklanması gibi) belirlenmesi amacıyla ön çalışmalar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 3’de özetlenmiştir.

**Antijen Retrieval:** Optimum immünohistokimyasal işaretlenmenin elde edilebilmesi için bazı primer antikorlar ile inkübasyon öncesi kesitlere, antijenitenin yeniden kazandırılması işlemi uygulandı. AR işlemi sırasında, kesitler önce 30 dk. süreyle 85°C’ye ayarlanmış etüvde, ön ısıtma yapılmış AR solüsyonda (solüsyon son sıcaklığı 73-75°C) inkübe edildi. Takiben viallerin kapağı açılmadan oda sıcaklığında 15 dk. süreyle aynı solüsyonda bekletildi. AR işleminde 50 mM trisodyum sitrat tamponu<sup>5</sup> (pH 6) ya da 1 mM EDTA solüsyonu<sup>6</sup> (pH 8) kullanıldı (Tablo 3).

**Endojen peroksidaz aktivitesinin bloklanması:** Çalışmada kullanılmak üzere seçilen bazı antikorların, endojen peroksidaz aktivitesine bağlı zemin boyanmasına neden olduğu gözlemlendi. Spesifik boyanmayı baskılayan bu tip işaretlenmeyi önlemek için kesitler, AR işlemi sonrası yıkamayı takiben Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu ya da %40 metanolde hazırlanmış %1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda inkübe edildi (Tablo 3).

Çalışmada kullanılması planlanan pSTAT3 antikoruna ile yapılan ön çalışmalarda iki farklı üreticiye ait antikor denenmesine karşın spesifik boyanma elde edilemedi. Aynı şekilde iyonotropik glutamat reseptör alt birimleri olan GluK1, GluK2 ve GluK3 reseptör proteinleri için ayrı ayrı geliştirilen antikorlarla da pozitif sonuçlar alınmadı. Bu nedenle ikili immünoperoksidaz işaretleme protokollerinde c-Fos, pCREB ve pSTAT5 antikorları, ikili floresan boyamalarda ise her üç reseptör alt birim proteinini de tanıdığımız bildiğimiz GluK1/2/3 antikoruna kullanıldı.

---

<sup>5</sup> 50 mM tri sodyum sitrat tamponu hazırlanışı. Trisodium sitrat pentahidrat 17,858 g/1000 ml dH<sub>2</sub>O (pH 6).

<sup>6</sup> 1 mM EDTA tamponu hazırlanışı. Etilendiamin tetra asetik asit disodyum 2 sulu, 0,372 g/1000 ml dH<sub>2</sub>O. (pH 8)

İmmünohistokimyasal boyama viallerde yüzen kesitlere uygulandı. İnkübasyonlar ve yıkama işlemleri sırasında kesitlerin tüm yüzeylerinin solüsyonla temas etmesi için orbital karıştırıcı kullanıldı. Yıkama işlemleri için 0,05 M Tris-HCl solüsyonu, non-spesifik bağlanmayı bloklamak ve antikorları dilüe etmek için ise bloklayıcı serum<sup>7</sup> kullanıldı.

### 3.4. İmmünohistokimyasal Boyamaların Kontrolü

Çalışma için seçilen antikorların özgünlüğünü değerlendirmek için boyamalar sırasında primer ve sekonder antikorlar için kontrol kesitleri kullanıldı. Kontrol kesitlerine primer antikor ya da sekonder antikor yerine normal bloklayıcı serum kullanıldı. Kontrol boyamalarında hiçbir işaretlenme gözlenmedi.

**Tablo 2.** Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikorlar.

Antikor	Üretici Firma	Katalog no
Tavşan anti-pSTAT5	Cell Signaling Technology	9351
Tavşan anti-c-Fos	Oncogene	PC-38
Tavşan anti-p-CREB	Millipore	06-519
Keçi-anti-GluK5 (C-20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-8915
Fare anti-GluK1/2/3 (IgM)	Chemicon Int.	MAB379
Fare anti-GluA1	Acris	AM60040PU-N
Fare anti-GluA2	Millipore	MAB397
Fare anti-GluA3	Millipore	MAB5416
Keçi anti-GluA4	LifeSpan BioSciences, Inc.	LS-B3606
Fare anti-GluN1	BD Pharmingen	556308
Fare anti-GluN2A	Millipore	MAB5216
Tavşan anti-nöronostatin	Phoenix Pharmaceuticals, Inc.	H-060-50
Tavşan anti-nesfatin-1	Phoenix Pharmaceuticals, Inc.	H-003-22

<sup>7</sup> Bloklayıcı serum hazırlanışı. (%10 normal at serumu, %0.1 sodyum azid ve %0.2 triton-X 100)



**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan primer antikorların dilüsyonları, inkübasyon süreleri, sıcaklıkları ve ön uygulamaları.

Kullanılan Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	İnkübasyon Sıcaklıkları	Endojen Peroksidaz Aktivitesinin Bloklanması		AR İşlemi	
				%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Süre	Tampon	pH
Keçi-anti-GluK5	1:2.000	72 saat	+4°C	%3	10 dk.	-	-
Fare anti-GluK1/2/3 (IgM)	1:900	48 saat	+4°C	%3	10 dk.	sodyum sitrat	6
Fare anti-GluA1	1:500	48 saat	+4°C	-	-	-	-
Fare anti-GluA2	1:1.000	48 saat	+4°C	-	-	-	-
Fare anti-GluA3	1:1.000	48 saat	+4°C	-	-	-	-
Keçi anti-GluA4	1:500	48 saat	+4°C	%3	10 dk.	sodyum sitrat	6
Fare anti-NR1	1:300	48 saat	+4°C	%3	10 dk.	EDTA	8
Fare anti-NR2A	1:1.000	48 saat	+4°C	-	-	-	-
Tavşan anti-pSTAT5	1:2.000	6 gece	+4°C	%1	30 dk.	EDTA	8
Tavşan anti-c-Fos	1:20.000	1 gece	OS	-	-	-	-
Tavşan anti-pCREB	1:500	1 gece	OS	-	-	-	-
Tavşan anti-nöronostatin	1:4.000	3 gece	OS	%3	10 dk.	sodyum sitrat	6

OS: Oda sıcaklığı

### 3.5. Deney Prosedürü

**Özgün hedef 1: Nöronostatin nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistem etkilerinin ve aktivasyon yollarının araştırılması:** Çalışmanın bu bölümünde deneklere glutamaterjik sistemin etkinliğini gözlemleyebilmek amacıyla %0,9 NaCl’de çözdürülen glutamat agonistleri (kainik asit, AMPA ve NMDA) intraperitoneal yolla verildi. Kontrol gruplarına, agonistlerin çözüldüğü hacimde %0,9 NaCl aynı yolla uygulandı. (Hayvan deneyi protokolü ve agonist dozajları Tablo 4’te verilmiştir). Enjeksiyonlardan 90 dk. sonra dekapite edilen deneklerin beyinlerinden alınan koronal kesitlerde, nöronostatin nöronlarının aktive olup olmadıkları araştırıldı. Nöronostatin nöronlarının aktivasyonu, dolayısıyla glutamaterjik sistemin etkinliği, aktive olan hücre içi yollar ve nöronal aktivasyon düzeyinde incelendi. Bu amaçla; hücre içi yollarda işlev gören c-Fos, pCREB ve pSTAT5 proteinlerinden birinin hücre çekirdeğindeki ekspresyonu hücre içi aktivasyon belirteci olarak kullanıldı. İkili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile bu proteinlerden bir ya da birkaçını eksprese eden nöronostatin nöronlarının varlığı değerlendirildi.

**Tablo 4.** Hayvan deneyi protokolü.

Glutamat Reseptör Agonisti	Grubun Adı	Dozaj (Enjeksiyonun Miktarı)
<b>Kainik Asit Grubu</b>	Kontrol grubu (n=10, 5 erkek+5 dişi), %0,9 NaCl	300 µl/denek, i.p.
	Agonist grubu (Kainik asit) (n=10, 5 erkek+5 dişi)	2.5 mg/kg, i.p. (300 µl/denek)
<b>AMPA Grubu</b>	Kontrol grubu (n=10, 5 erkek+5 dişi), %0,9 NaCl	500 µl/denek, i.p.
	Agonist grubu (AMPA) (n=10, 5 erkek+5 dişi)	5 mg/kg, i.p. (500 µl/denek)
<b>NMDA Grubu</b>	Kontrol grubu (n=10, 5 erkek+5 dişi), %0,9 NaCl	2 ml/denek, i.p.
	Agonist grubu (NMDA) (n=10, 5 erkek+5 dişi)	100 mg/kg, i.p. (2 ml/denek)

### **c-Fos ve NST proteinlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi için ikili immünoperoksidaz yöntemi**

Kesitler;

1. Kriyoprotektanın uzaklaştırılması için Tris tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
2. Antijenitenin geri kazandırılması için Na-Sitrat tamponunda (pH 6,0) 85°C’de 30 dk. inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler oda sıcaklığında aynı solüsyonda 15 dk. daha bekletildi.

3. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
4. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'te (Tris tamponunda hazırlanmış) 10 dk. bekletildi.
5. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
6. Non-spesifik bağlanmanın baskılanması için bloklayıcı serum ile (%10 normal at serumu) 2 sa. inkübe edildi.
7. Tavşan anti-c-Fos antikoruna ile (1:20000) oda sıcaklığında 1 gece inkübe edildi.
8. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
9. Biotin-konjuge eşek anti-tavşan (1:300) sekonder antikor solüsyonunda ile oda sıcaklığında 2 sa. bekletildi.
10. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
11. Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonunda (100 µl A ve 100 µl B solüsyonu/5 ml Tris-HCl) 1 sa. bekletildi.
12. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
13. Substrat kromojen solüsyonu olan Ni-DAB (Nikel 1 g, 12,5 mg DAB, 1,3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/50 ml Tris-HCl)'da 6 dk. boyandı.
14. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
15. Bloklayıcı serum solüsyonunda 2 sa. bekletildi.
16. Tavşan anti-nöronostatin (1:4000) antikor solüsyonunda oda sıcaklığında 3 gece inkübe edildi.
17. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
18. Biotin-konjuge eşek anti-tavşan (1:400) solüsyonunda oda sıcaklığında 2 sa. bekletildi.
19. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
20. Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonunda 1 sa. inkübe edildi.
21. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkandı.
22. Substrat kromojen solüsyonunda (DAB; 12,5 mg DAB, 1,3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/25 ml Tris-HCl) 8 dk. süreyle antikor-antijen-enzim kompleksi renklendirildi.
23. Tris-HCl tamponu ile 3×10 dk. yıkamayı takiben, lamlara yayılarak kurutulan kesitler DPX ile kapatıldı.

## **pSTAT5 ve NST proteinlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi için ikili immünoperoksidaz yöntemi**

Kesitler;

1. Antijenitenin geri kazandırılması için 85°C'de 1 mM EDTA'da (pH 8,0) 30 dk. takiben oda sıcaklığında, aynı solüsyonda 15 dk. daha bekletildi.
2. Endojen peroksidaz aktivitesinin bloklanması için %1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de (%40 metanolde hazırlanmış) 30 dk. inkübe edildi.
3. %10 normal at serumunda 2 saat bekletilerek non-spesifik bağlanma baskılandı.
4. Tavşan anti-pSTAT5 (1:2000) ile +4 °C'de 6 gece inkübe edildi.
5. Biotin-konjuge eşek anti-tavşan (1/300) solüsyonu ile oda sıcaklığında 2 sa. bekletildi.
6. Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonunda 1 sa. bekletildi.
7. Antijen-antikor-enzim kompleksinin renklendirilmesi için Ni-DAB (1,5 g Nikel, 12,5 mg DAB ve 1,3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/50 ml Tris-HCl tamponu) 30 dk. inkübe edildi.
8. Nöronostatin antijenitesinin geri kazandırılması için 85°C'de tri sodyum sitrat tamponunda (pH 6,0) 30 dk. takiben oda sıcaklığında, aynı solüsyonda 15 dk. daha bekletildi.
9. Non-spesifik bağlanmanın baskılanması için %10 normal at serumunda 2 sa., bekletildi.
10. Tavşan anti-NST (1:4000) 3 gece inkübe edildi.
11. Biotin-konjuge eşek anti-tavşan (1:400) solüsyonunda oda sıcaklığında 2 sa., bekletildi.
12. Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonunda 1 sa. inkübe edildi.
13. Antijen-antikor-enzim kompleksinin görülebilir hale gelmesi için substrat-kromojen solüsyonunda (12,5 mg DAB, 1,3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /25 ml Tris-HCl tamponu) 8 dk., bekletildi.
14. Lamlara yayıldı ve DPX ile kapatıldı.

Non-spesifik bağlanmanın bloklanması ile primer antikör inkübasyon basamağı arası hariç tüm işlemler arasında kesitler Tris-HCl tamponunda 3 kez 10'ar dakika yıkandı.

## **pCREB ve NST proteinlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi için ikili immünoperoksidaz yöntemi**

Kesitler;

1. Antijen retrieval işlemi için 1mM EDTA'da inkübe edildi (etüv sıcaklığı 85°C, solüsyon sıcaklığı 73-75°C, pH 8,0, 30 dk.). Etüvden çıkarıldıktan sonra 15 dk. aynı solüsyonunda oda sıcaklığında bekletildi.
2. %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tris-HCl tamponunda hazırlanmış) 10 dk. bekletildi.
3. Non-spesifik bağlanmanın baskılanması için %10 normal at serumunda 2 sa. bekletildi.
4. Tavşan anti-pCREB (1:500) ile 1 gece inkübe edildi.
5. Sekonder antikor inkübasyonu için biyotin-konjuge eşek anti-tavşan (1:200) solüsyonunda oda sıcaklığında 2 sa. bekletildi.
6. Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonu ile 1 sa. muamele edildi.
7. Substrat-kromojen solüsyonu (Ni-DAB) ile antijen-antikor-enzim kompleksinin görülebilir hale getirilmesi için 11 dk. inkübe edildi.
8. Non-spesifik bağlanmanın baskılanması için %10 normal at serumunda 2 sa. bekletildi.
9. Primer antikor inkübasyonu için tavşan anti-NST (1:4000) ile 3 gece muamele edildi.
10. Sekonder antikor inkübasyonu için biotin-konjuge eşek anti-tavşan (1:400) solüsyonunda oda sıcaklığında 2 sa. bekletildi.
11. Avidin biyotin kompleksi (ABC) solüsyonunda 1 sa. inkübasyona bırakıldı.
12. Antijen-antikor-enzim kompleksinin görülebilir hale gelmesi için substrat-kromojen solüsyonu ile (12,5 mg DAB, 1,3 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /25 ml Tris-HCl tamponu) 8 dk. boyandı.
13. Lamlara yayıldı ve DPX ile kapatıldı.  
Non-spesifik bağlanmanın bloklanması ile primer antikor inkübasyon basamağı arası hariç tüm işlemler arasında kesitler Tris-HCl tamponunda 3 kez 10'ar dakika yıkandı.

**Özgün hedef 2: Nöronostatin nöronlarının fizyolojik olarak uyarılması ve glutamat antagonistlerinin bu uyarılmadaki etkinliğinin araştırılması:** Tez çalışmasının bu bölümünde öncelikle çevre koşullarını (ortam ısısı gibi) kontrol altında tutabilmek amacıyla, deneklerin diüurnal ritimleri değiştirildi. Aydınlık-karanlık periyotları her gün 2 saat ötelenerek yaklaşık bir haftada karanlık periyot 9:00-19:00, aydınlık periyot ise 19:00-9:00 saatleri arasında olacak şekilde ayarlandı. 15 gün süreyle sıçanların yeni ritme uyum sağlamaları beklendi. Deneyin başlangıcında tam bir açlık oluşturabilmek için denekler tek tek metabolik kafeslere yerleştirildi. En az 3-4 gün süreyle yemek ve su serbest bırakılarak deneklerin metabolik kafeslere adaptasyonları sağlandı. Deney sürecinde 48 saat süreyle aç bırakılan denekler karanlık periyot başlangıcında açlık, açlık sonrası beslenme (tokluk) ve antagonist grupları olmak üzere üçe ayrıldı. Her üç grupta da deney sırasında su alımı serbest bırakıldı. Açlık grubundaki denekler 48 saatlik açlık sonrası, beslenme grubundaki sıçanlar açlığı takiben 2 saat süreyle beslendikten sonra dekapite edildi. Antagonist grubundaki deneklere açlık süresinin bitiminde intraperitoneal yolla antagonist uygulandı. Antagonist uygulamasından 15 dakika sonra deneklere yemleri verilerek 2 saat süreyle beslenmeleri sağlandı. Non-NMDA reseptör antagonisti olarak CNQX ve NMDA reseptörlerinin antagonize edilmesi için ise MK-801 kullanıldı. Antagonistler %0,9 NaCl'de çözüldü. Hayvan deneyi protokolü tablo 5'te verildiği gibi uygulandı. Deney süresince deneklerin ağırlıkları ve tükettikleri besin miktarları takip edildi (Tablo 6).

**Tablo 5.** Hayvan deneyi protokolü.

Grup	Besleme öncesi uygulama	Besleme süresi	Doz	
Açlık grubu (n=10, 5 erkek+5 dişi)	48 saat açlık	-	-	
Yeniden beslenme grubu (tokluk) (n=10, 5 erkek+5 dişi)	48 saat açlık	2 saat	-	
Antagonist grubu	CNQX (n=10, 5 erkek+5 dişi)	48 saat açlık ve antagonist uygulaması	2 saat	1 mg/kg/300 µl
	MK-801 (antagonist)	48 saat açlık ve antagonist uygulaması	2 saat	0,2 mg/kg/300 µl

**Tablo 6.** Deneklerin ağırlık ve yem tüketim miktarları.

	Cinsiyet	Açlık öncesi ağırlık (g)	Açlık sonrası ağırlık (g)	Ağırlık kaybı (g)	Verilen yem (g)	Kalan yem (g)	Tüketilen yem (g)
SS13	Erkek	221	178	43	46,96	43,90	3,06
SS14	Erkek	294	257	37	52,63	46,50	6,1
SS18	Erkek	225	178	47	22,05	16,07	5,98
SS19	Erkek	183	146	37	27,58	23,07	4,51
SS20	Erkek	223	178	45	20,11	16,08	4,03
SS21	Erkek	237	199	38	40,36	25,87	14,49
SS22	Erkek	184	170	16	38,3	30,5	7,8
SS67	Erkek	283	248	35	46,36	38,23	8,13
SS68	Erkek	224	214	10	43,99	35,95	8,04
SS69	Erkek	264	231	33	38,61	30,26	8,35
SS70	Erkek	212	187	25	44,02	37,58	6,44
SS74	Erkek	222	195	27	39,81	34,18	5,63
SS75	Erkek	295	255	40	47,06	39,82	7,24
SS76	Erkek	231	210	21	54,58	50,83	3,75
SS15	Erkek	215	182	33	-	-	-
SS16	Erkek	246	203	43	-	-	-
SS17	Erkek	178	138	40	-	-	-
SS63	Erkek	235	206	29	-	-	-
SS64	Erkek	269	231	38	-	-	-
SS65	Erkek	224	205	19	-	-	-
SS66	Erkek	273	243	30	-	-	-
SS71	Erkek	237	207	30	-	-	-
SS72	Erkek	305	274	31	-	-	-
SS73	Erkek	295	257	38	-	-	-
SS135	Erkek	227	207	20	47,09	41,73	5,36
SS136	Erkek	310	269	41	46,83	36,33	10,5
SS137	Erkek	311	266	45	48,99	36,69	12,30
SS138	Erkek	189	171	18	44,86	41,25	3,51
SS141	Erkek	283	252	31	49,32	40,87	8,35
SS142	Erkek	178	160	18	44,97	44,97	0
SS148	Erkek	268	241	27	59,49	59,49	0
SS51	Dişi	178	145	33	33,42	26,96	6,46
SS52	Dişi	177	152	25	38,01	30,98	8,03
SS53	Dişi	204	163	41	46,53	39,02	7,51
SS54	Dişi	222	181	41	47,51	41,34	6,17
SS85	Dişi	255	214	41	37,90	33,60	4,3
SS86	Dişi	255	215	40	39,54	36,15	3,39
SS87	Dişi	228	194	34	42,78	39,50	3,28
SS47	Dişi	206	177	29	-	-	-
SS48	Dişi	185	166	19	-	-	-
SS49	Dişi	210	181	29	-	-	-
SS50	Dişi	194	168	26	-	-	-
SS88	Dişi	211	180	31	-	-	-
SS89	Dişi	196	165	31	-	-	-
SS90	Dişi	221	184	37	-	-	-
SS149	Dişi	173	157	16	49,05	44,22	4,83
SS150	Dişi	219	183	36	48,22	43,80	4,42
SS151	Dişi	245	207	38	41,98	36,34	5,64
SS152	Dişi	162	158	4	38,92	26,52	11,40
SS155	Dişi	225	191	34	51,75	51,75	0

Nöronostatin nöronlarının aktivasyonu, özgün hedef 1'de kullanılan aktivasyon belirteçleri kullanılarak ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile araştırıldı. Boyama sonrasında c-Fos, pCREB ve/veya pSTAT5 için pozitif olan NST nöronları değerlendirildi.

Bu grupta besleme ile uyarılmanın olup olmadığının kontrolü için, besin alımı ile uyarıldığı bilinen ve anoreksijenik bir peptit olan nesfatin sentezleyen nöronlardaki c-Fos protein ekspresyonu değerlendirildi (Kohno ve ark., 2008). Bu amaçla, hipotalamusun supraoptik çekirdeğini içeren bazı kesitler, c-Fos eksprese eden nesfatin nöronlarının gösterilmesi için ikili indirekt immünoperoksidaz yöntemi ile boyandı.

**Özgün Hedef 3: Nöronostatin nöronlarında glutamat reseptörlerinin varlığı (GluN1, GluN2A, GluA1-4 ve GluK1-3 ve 5)** ikili immünofloresans yöntem ile işaretlenen kesitlerde incelendi. Bu bölümde deneklere herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. 10 dişi ve 10 erkek sıçan perfüzyon fiksasyon yolu ile sakrifiye edilerek 40 µm kalınlığında vibratom kesitler alındı.

### **İkili İmmünfloresans İşaretleme Prosedürü,**

Kesitler;

1. Antijenitenin geri kazandırılması için 1 mM EDTA'da (pH 8,0) ya da Na-sitrat tamponunda (pH 6,0) 85°C'de 30 dk. inkübe edildi ve solüsyon soğuyuncaya kadar 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
2. Endojen peroksidaz aktivitesinin baskılanması için %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de (Tris tamponunda hazırlanmış) 10 dk. bekletildi.
3. Non-spesifik bağlanmanın baskılanması için %10 normal at serumu ile 2 sa. muamele edildi.
4. Primer antikor karışımı ile inkübasyon için tavşan anti-nöronostatin (1:4000) ve glutamat reseptör alt birimlerinden (GluN1, GluN2A, GluA1, GluA2, GluA3, GluA4 ve GluK1/2/3 ya da GluK5) birine karşı geliştirilmiş antikor (antikorların dilüsyon oranları Tablo 3'de verilmiştir) ile hazırlanan karışımda 3 gece bekletildi.
5. Sekonder antikor ve/veya sekonder antikor karışımı ile inkübe edildi:
  - a. GluN1, GluN2A, GluA1, GluA2, GluA3, GluA4 ve GluK5 için; Alexa Fluor® 488 konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:500) ve Alexa Fluor® 594 eşek anti-keçi IgG (1:500) ya da Alexa Fluor® 594 eşek anti-fare IgG (1:500) 2 sa.,



- b. GluK1/2/3 için; Biotin-konjuge eşek anti-fare IgM (1:200) solüsyonunda 2 sa. ve takiben sekonder antikor karışımı [Alexa Fluor® 488 konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:400) ve streptavidin-TR (1:100)] ile inkübasyon, 2 sa.,
6. Floresan mikroskopta inceleme öncesi Prolong Anti-Fade ile kapatıldı. Non-spesifik bağlanmanın bloklanması ile primer antikor inkübasyon basamağı arası hariç, tüm işlemler arasında kesitler Tris-HCl tamponunda 3 kez 10'ar dakika yıkandı.

### **3.6. Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz**

İkili immunoperoksidaz ve ikili immunofloresans yöntemi ile işaretlenen kesitlerin incelemesi Olympus BX-FLA Reflected Light Fluorescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopta 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde gerçekleştirildi.

Çalışmalar kapsamında yapılan tekli ve ikili işaretlemeler için Paxinos ve Watson (2009) sıçan beyin atlasına göre belirlenen koordinatlar arasındaki (Periventriküler çekirdek için bregma -0.24 mm ile -3.60 mm) kesitler kullanıldı. Hücre sayımı için rostrokaudal düzlemde, her denek için aynı koordinatta ve birbirine eşit uzaklıkta 5 farklı seviyeden alınan kesitler kullanıldı.

İkili immünoperoksidaz işaretlenmiş kesitlerde hem tüm nöronostatin-pozitif nöronlar sayıldı hem de bu nöronların c-Fos, pSTAT5 ya da pCREB-immünoreaktif olanlarının sayıları belirlendi. Daha sonra her denek için c-Fos, pSTAT5 ya da pCREB işaretli nöronların tüm nöronostatin nöronlarına oranı hesaplandı. İkili işaretlenen nöronların tüm nöronlara oranı hesaplanarak her bir denek için elde edilen yüzdelerin grup içi ortalama ve standart hataları (SEM) belirlendi.

Deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile, istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Student-Newman-Keuls testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi. Cinsiyetler arası istatistiki farklılıklar ANOVA ve takiben Student t testi ile araştırıldı.

## 4. BULGULAR

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları özgün hedef sıralamasına göre aşağıda verilmiştir.

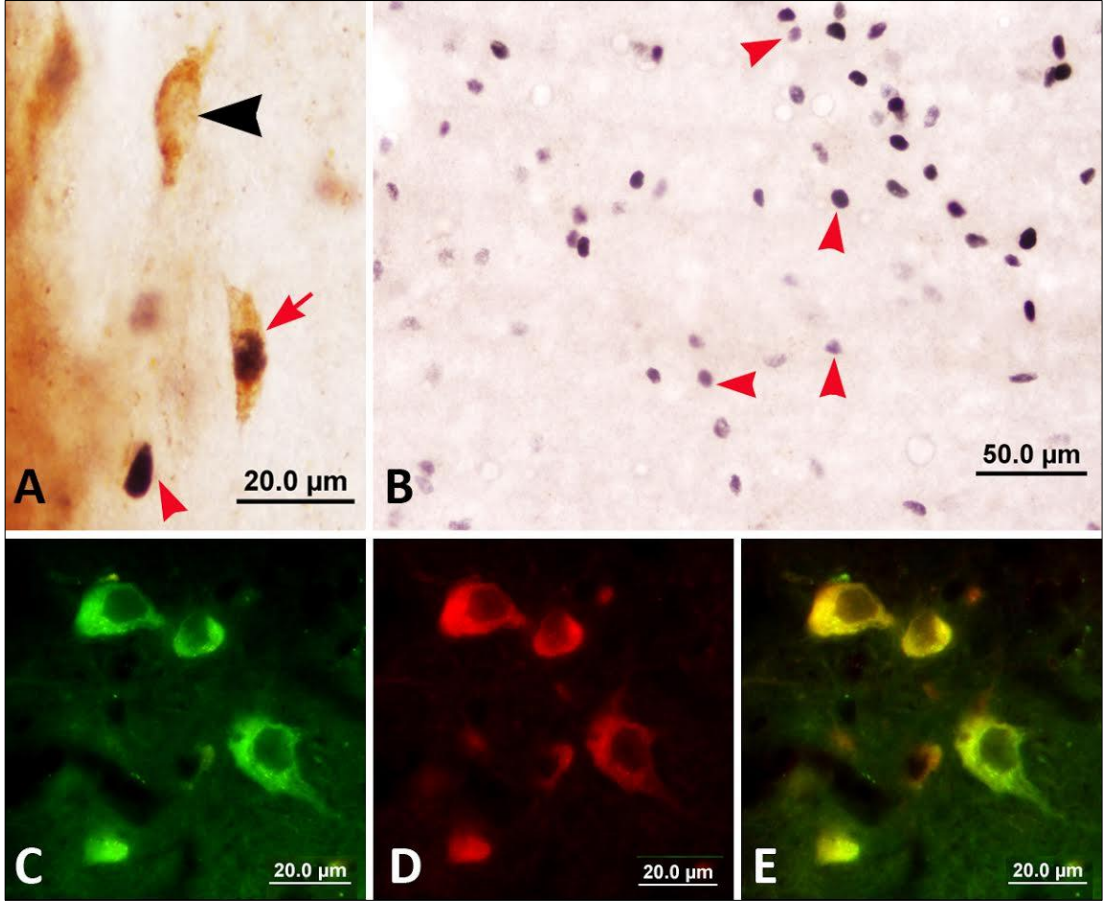
### 4.1. İmmünohistokimyasal Boyama Genel Sonuçları

İmmünohistokimya tekniği kullanılarak yapılan işaretlemelerde, diaminobenzidin (DAB) kullanılarak renklendirilen, nöronostatin antikoru ile oluşturulan sitoplazmik antijen-antikor-enzim kompleksine ait sinyaller ışık mikroskopunda kahverengi olarak gözlemlendi (Şekil 6A). Çekirdekte eksprese edilen c-Fos, pSTAT5 ve pCREB proteinleri ise nikel amonyum sülfat ile zenginleştirilmiş DAB (Ni-DAB) kullanılarak görülür hale getirildi. Bu reaksiyon ekspresyon miktarına bağlı olarak açık griden koyu menekşe rengi-siyaha değişen tonlarda izlendi (Şekil 6A ve B). Hem çekirdekte hem de sitoplazmalarında sinyal belirlenen nöronlar ikili işaretlenmiş olarak kabul edildi (Şekil 6A).

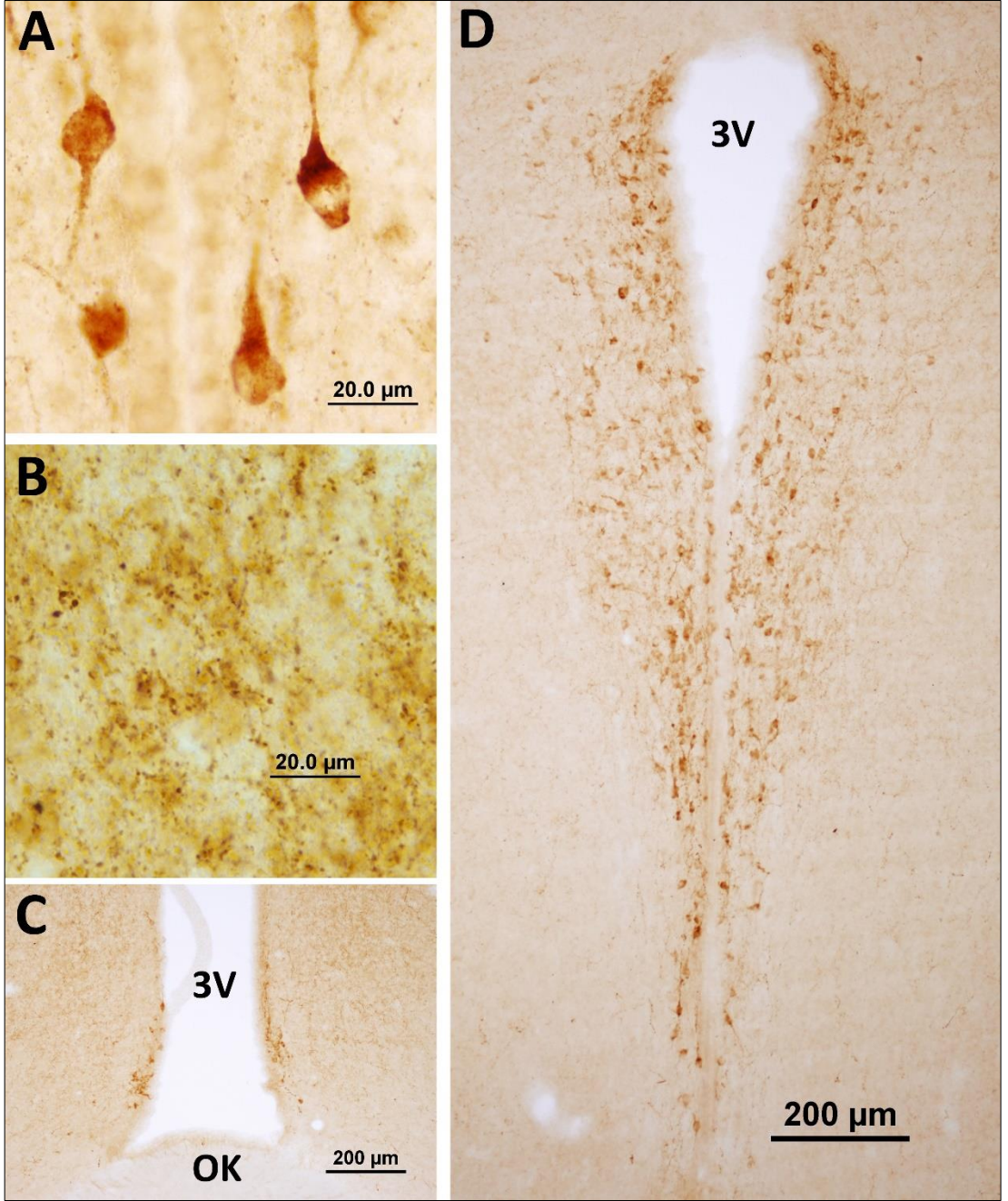
İkili immünofloresan işaretlemelerde, nöronostatin proteini yeşil renkte sinyal veren florokromla (Alexa 488), glutamat reseptör alt birimi proteinleri ise kırmızı florokromlarla (Alexa 594 veya streptavidin-konjuge Texas-Red) işaretlendi (Şekil 6C ve D). Dijital ortamda çakıştırılan görüntülerde her iki proteini de eksprese eden nöronlar sarı renkte görüntülendi (Şekil 6E).

### 4.2. Hipotalamusta Nöronostatin Nöronlarının Dağılımı

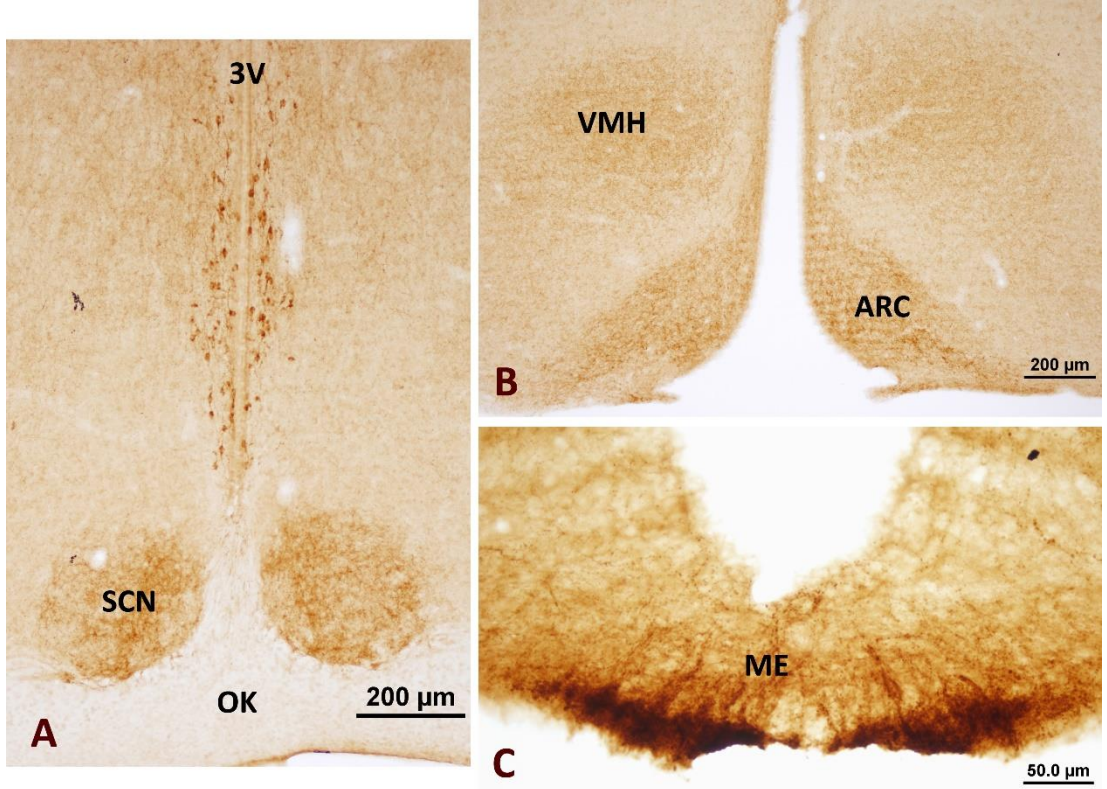
Nöronostatin-pozitif nöronların perikaryonlarının, hipotalamusta, 3. ventrikül çevresinde anterior periventriküler nükleusta yerleşim gösterdiği (Şekil 7), nöronostatin-pozitif akson terminallerinin SCN (Şekil 8A), ventromedial hipotalamik nükleus ile arkuat nükleusta (Şekil 8B) ve median emineste (Şekil 8C) bulunduğu belirlendi.



**Şekil 6.** İkili immünohistokimyasal işaretlemelerin değerlendirilmesi. A: İkili immünoperoksidaz işaretleme tekniğinde kahverengi sitoplazma (▲) ve siyah çekirdek (▲) ve ikili işaretlenmiş nöron (⬆). B: Griden koyu menekşe rengi-siyaha kadar değişebilen tonlarda çekirdek boyaması (▲). C: Yeşil florokrom ile işaretli peptiti eksprese eden nöronlar. D: Kırmızı florokrom ile işaretli glutamat reseptör alt birim proteini eksprese eden nöronlar. E: Peptit ile birlikte glutamat reseptör alt birim proteini eksprese eden nöronlar sarı renkte izlenmekte.



**Şekil 7.** Hipotalamusta nöronostatin nöronlarının dağılımı (A, C, D). Anterior hipotalamusun periventriküler çekirdeğinde, üçüncü ventrikül çevresinde yerleşim gösteren nöronostatin nöronları. (B) VMN'de gözlenen nöronostatin-pozitif akson sonlanmaları.



Şekil 8. Hipotalamusta nöronostatin-pozitif akson terminallerinin dağılımı. (A) suprakiazmatik nükleus (SCN), (B) ventromedial hipotalamik nükleus (VMN) ve arkuat nükleus (ARC), (C) median eminenste gözlenen akson sonlanmaları.

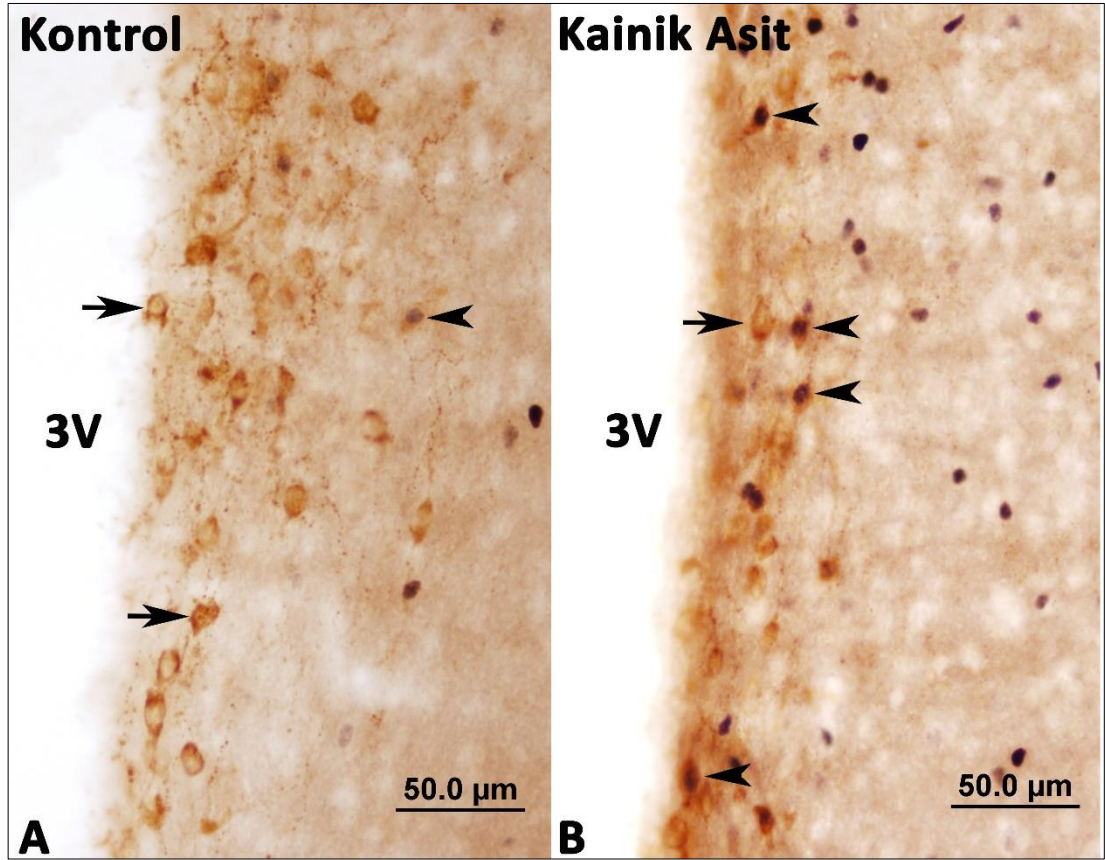
#### 4.3. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Glutamaterjik Sistem Etkilerinin ve Aktivasyon Yolaklarının Araştırılması

Çalışmanın bu bölümünde hipotalamusun anterior periventriküler çekirdeğinde yerleşik nöronostatin nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin etkilerini değerlendirmek amacıyla deneklere 3 farklı glutamat agonisti (kainik asit, AMPA, NMDA) uygulandı. Nöronostatin nöronlarında nöronal aktivasyonda yer alan hücre içi yolaklar ve nöronal aktivasyon düzeylerini belirlemek için, hücresel aktivasyon belirteçleri (c-Fos, pCREB ve pSTAT5) ve nöronostatin proteini ile ikili immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

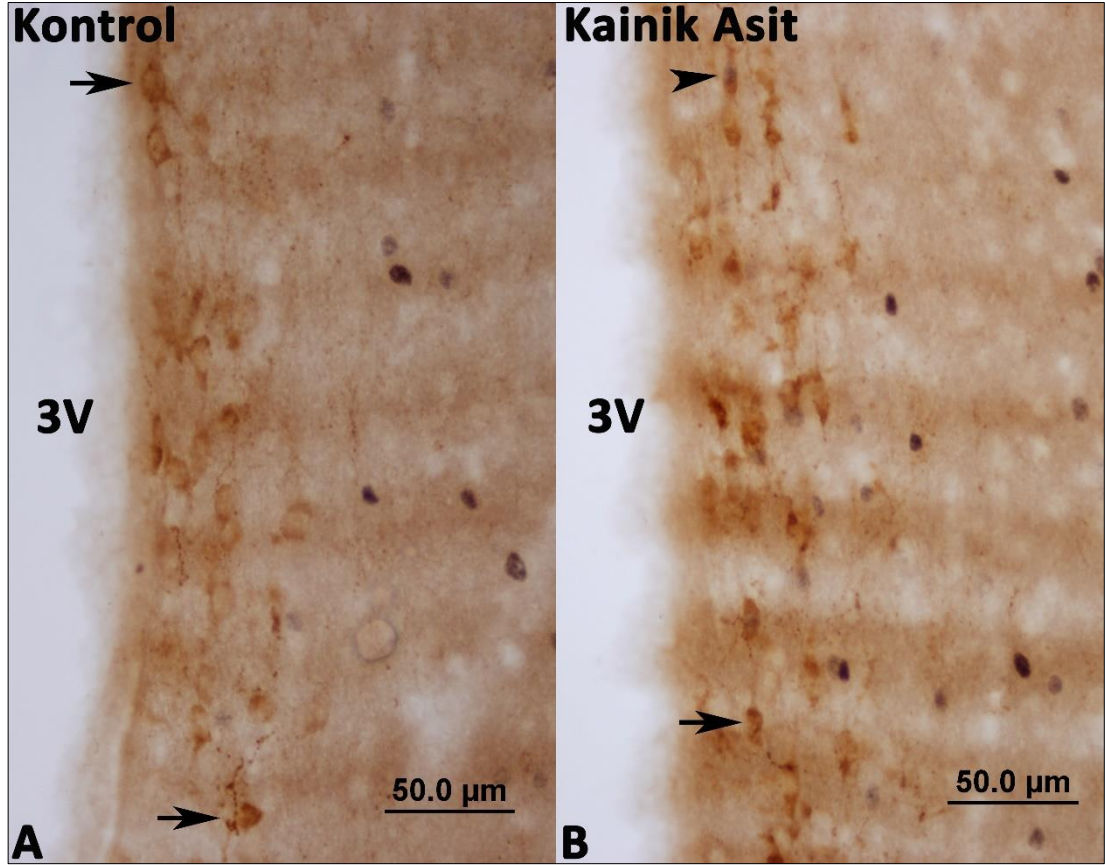
### 4.3.1. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Agonist Kainik Asitin Etkisi

#### 4.3.1.1. Kainik asit ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu

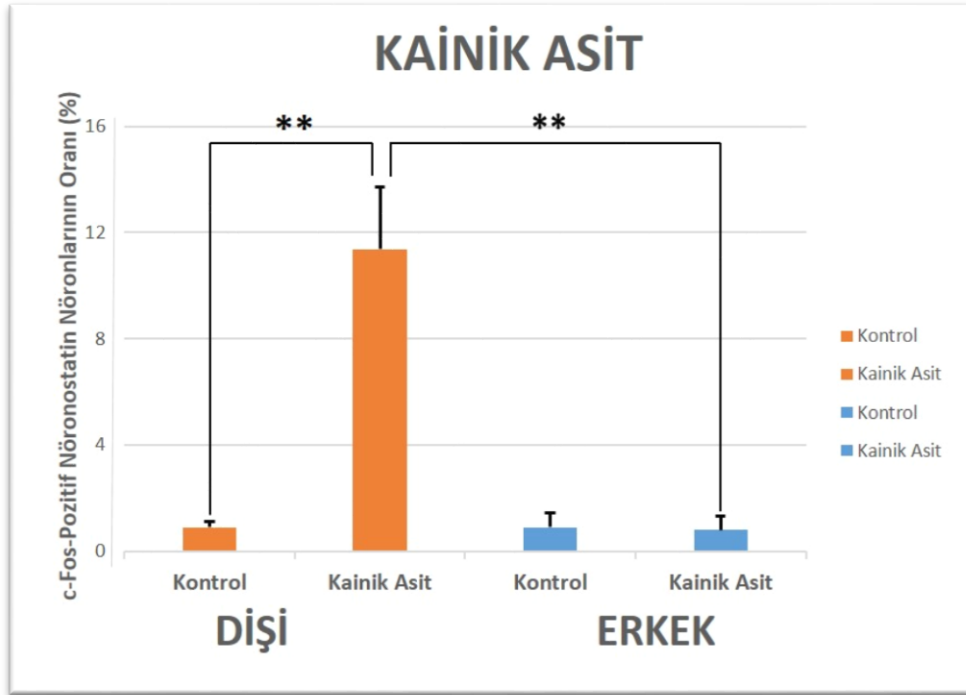
Dişi deneklerde, kainik asit enjeksiyonu sonrası hipotalamusun 3. ventrikül çevresinde anterior periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarının yaklaşık  $11,36 \pm 2,33$ 'ü c-Fos'u eksprese ederken, bu oran kontrol gruplarında  $0,89 \pm 0,20$  olarak belirlendi (Şekil 9). Erkek deneklerde ise bu değerler kainik asit grubunda  $0,78 \pm 0,51$ ; kontrol grubunda ise  $0,88 \pm 0,55$  idi (Şekil 10). Dişi deneklerde, kainik asit enjeksiyonu sonrası c-Fos-pozitif nöronostatin nöronlarının oranında kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark belirlenirken erkek deneklerde anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 11) ( $p < 0,01$ ). Kainik asit enjeksiyonu sonrası dişi deneklerde gözlenen c-Fos eksprese eden nöronostatin-pozitif nöron sayısındaki artışın erkek deneklere nazaran anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 11) ( $p < 0,01$ ).



Şekil 9. Kainik asit uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (▲).



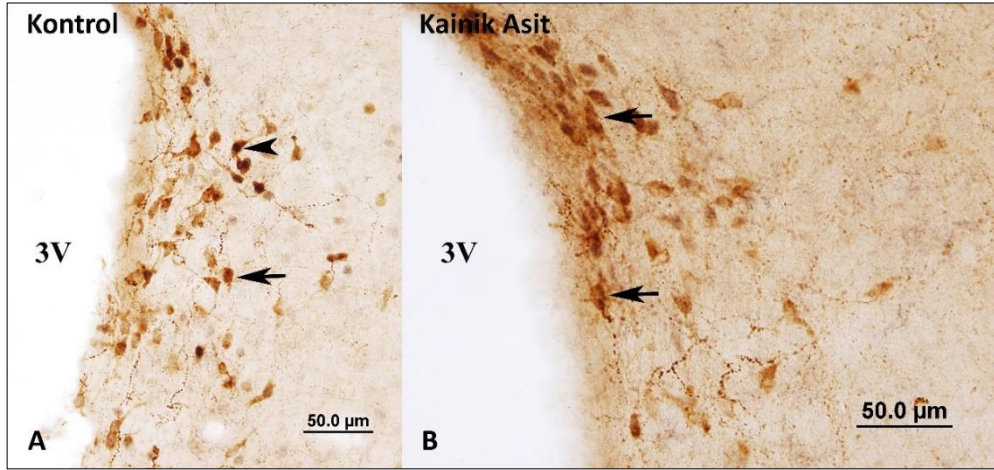
**Şekil 10.** Kainik asit uygulamasının erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (▲).



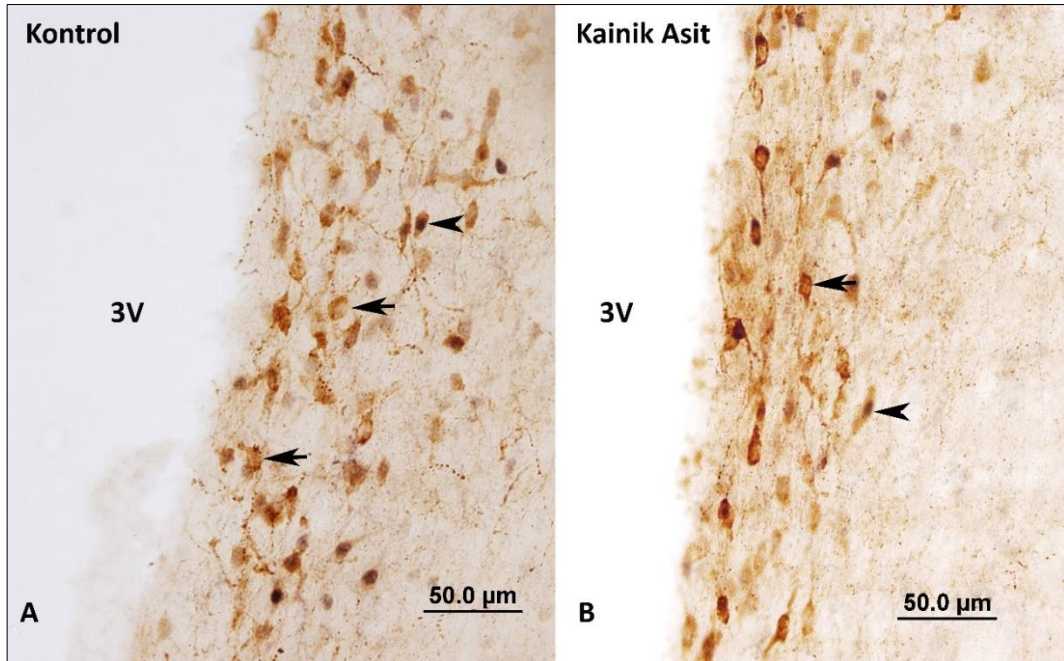
**Şekil 11.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte lokalize nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu. Dişi deneklerde, kontrol ve kainik asit grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu görüldü (\*\*  $p < 0.01$ ). Ayrıca; kainik asit enjeksiyonu yapılan gruplarda dişi ve erkek denekler arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi (\*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4.3.1.2. Kainik asit ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonu

Her iki cinsiyette de, kontrol gruplarında pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının varlığı gözlemlendi (Şekil 12A ve 13A). Kainik asit enjeksiyonunun STAT5'in fosforilasyonunu değiştirmediği belirlendi. Dişi (Şekil 12) ve erkek bireylerde (Şekil 13) pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının oranlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında farklılık görülmedi (Şekil 12 ve 13).



Şekil 12. Kainik asit uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. pSTAT5 proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (↑).

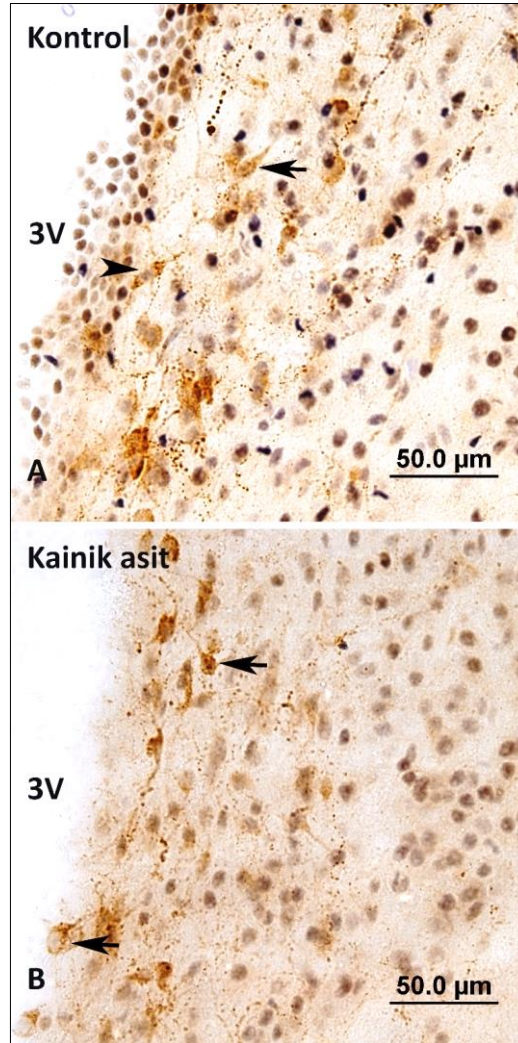


Şekil 13. Kainik asit uygulamasının erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. pSTAT5 proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (↑).



#### 4.3.1.3. Kainik asit ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pCREB ekspresyonu

Kainik asit enjeksiyonu sonrası nöronostatin ve pCREB antikorları kullanılarak yapılan ikili indirekt immünohistokimyasal boyamada kontrol ve agonist grupları arasında hipotalamusta pCREB immünoaktivitesinin yoğunluğu ve pCREB-pozitif çekirdeklerin dağılımı ve sayısı açısından farklılık gözlenmedi. Anterior hipotalamik periventriküler nükleus değerlendirildiğinde pCREB-pozitif nöronostatin nöronlarının sayısı açısından iki grup arasında bir fark belirlenmedi (Şekil 14).

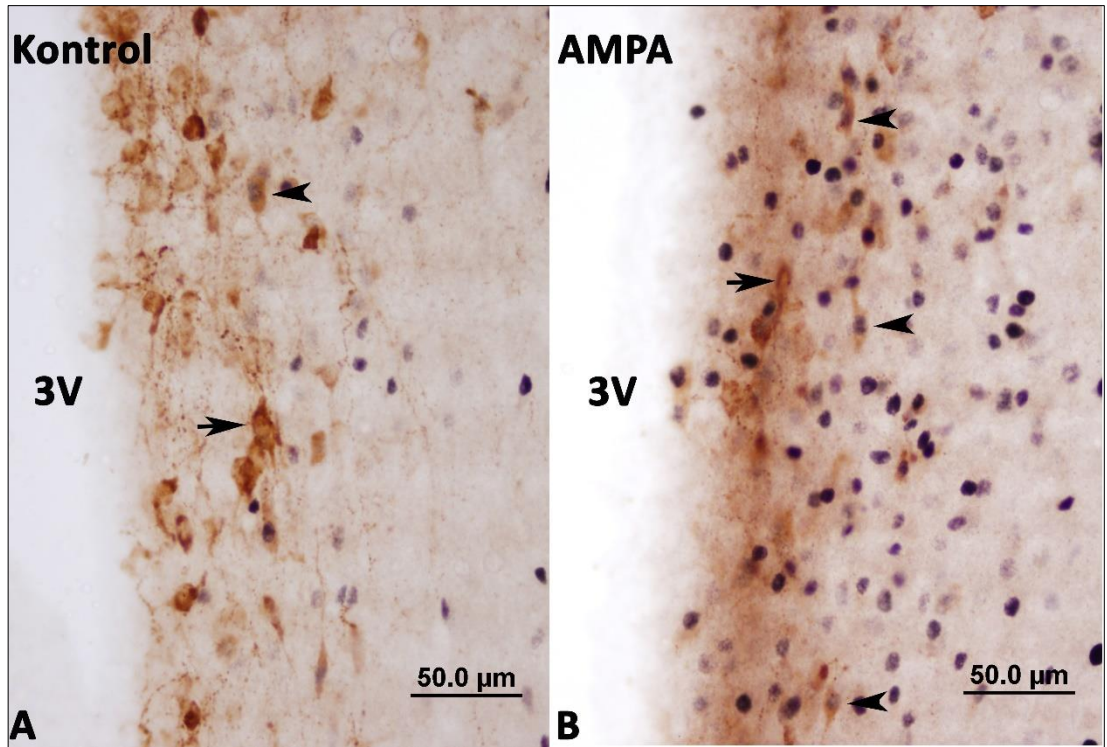


Şekil 14. Kainik asit uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pCREB ekspresyonuna etkisi. pCREB proteini ekspresye eden nöronostatin nöronları (▲) ve pCREB-negatif nöronostatin nöronları (▲).

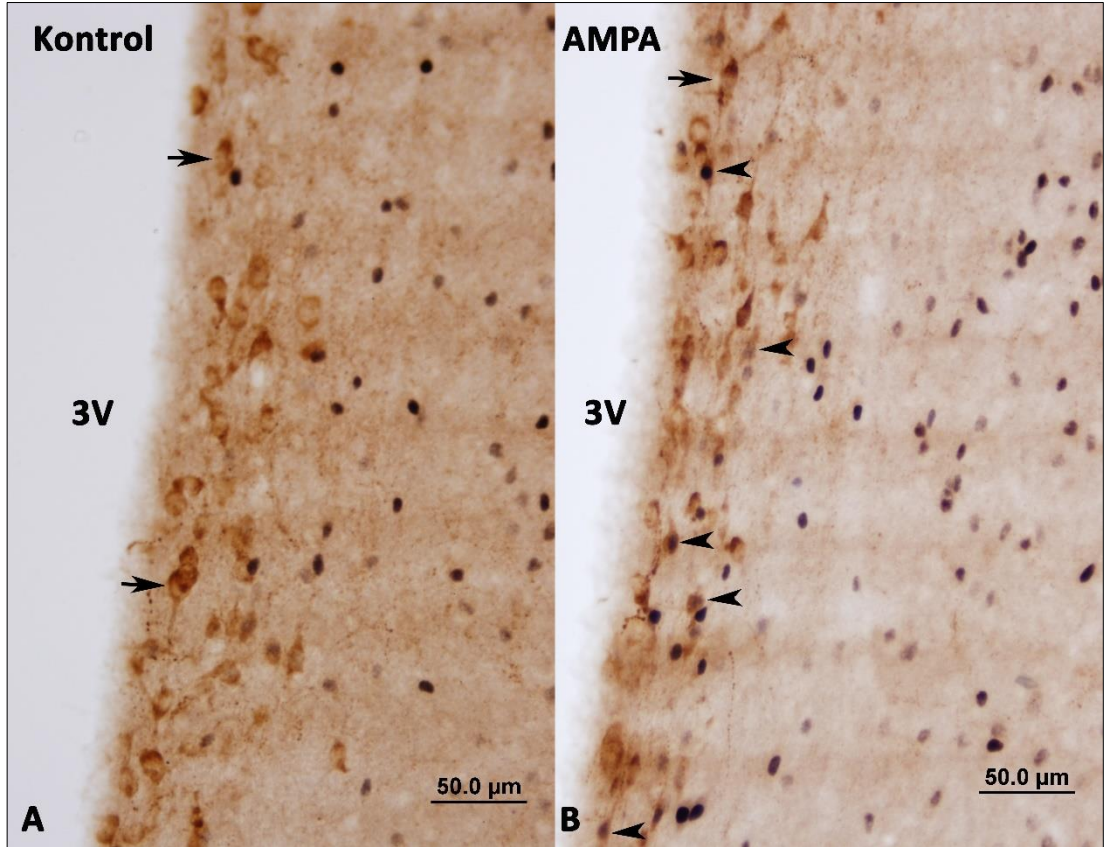
### 4.3.2. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Agonist AMPA'nın Etkisi

#### 4.3.2.1. AMPA ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu

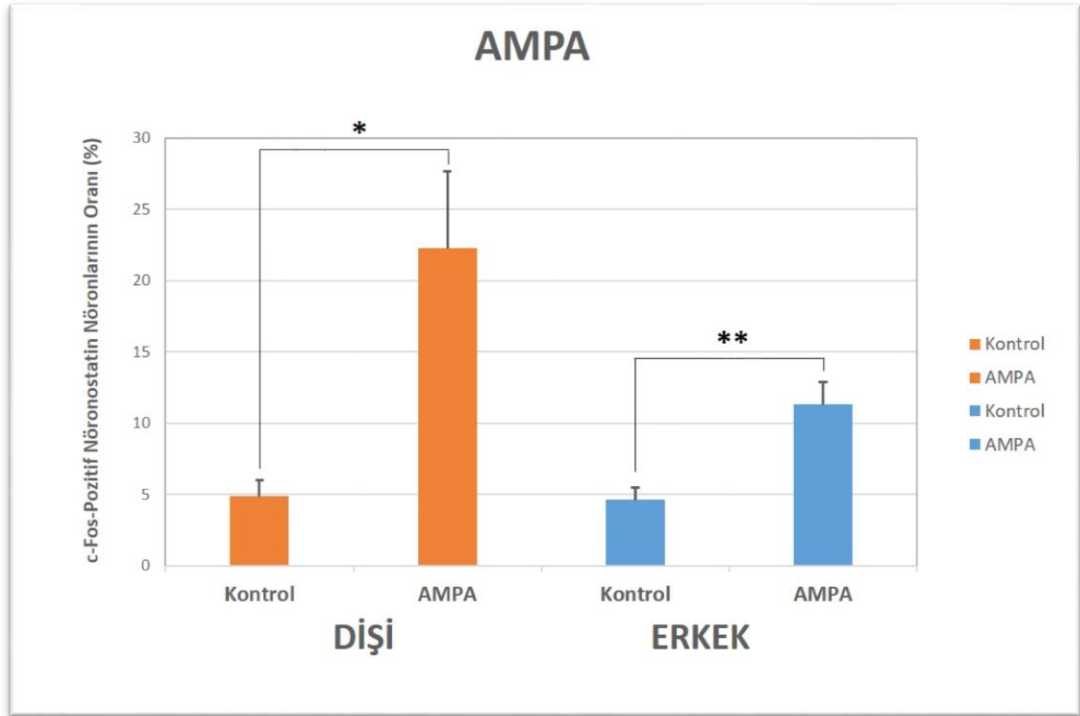
Dişi deneklerde, AMPA enjeksiyonu sonrası nöronostatin nöronlarının yaklaşık  $22,25 \pm 5,40$ 'ı c-Fos'u eksprese ederken, bu oran kontrol gruplarında  $4,86 \pm 1,11$  olarak belirlendi (Şekil 15). Erkek deneklerde ise AMPA enjeksiyonunun c-Fos-pozitif nöronostatin nöronlarının oranını  $4,6 \pm 0,86$ 'dan  $11,31 \pm 1,56$ 'e yükselttiği (Şekil 16); her iki cinsiyette gözlenen bu artışların kontrol grupları ile kıyaslandığında anlamlı olduğu belirlendi ( $p < 0,05$  ve  $p < 0,01$ ) (Şekil 17). Dişi deneklerde AMPA ile aktive olan nöronostatin nöron oranının, erkek deneklerde gözlenenin neredeyse iki katı olmasına karşın, bu fark istatistiksel karşılaştırmada anlamlı bulunmadı.



Şekil 15. Dişi deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (↑).



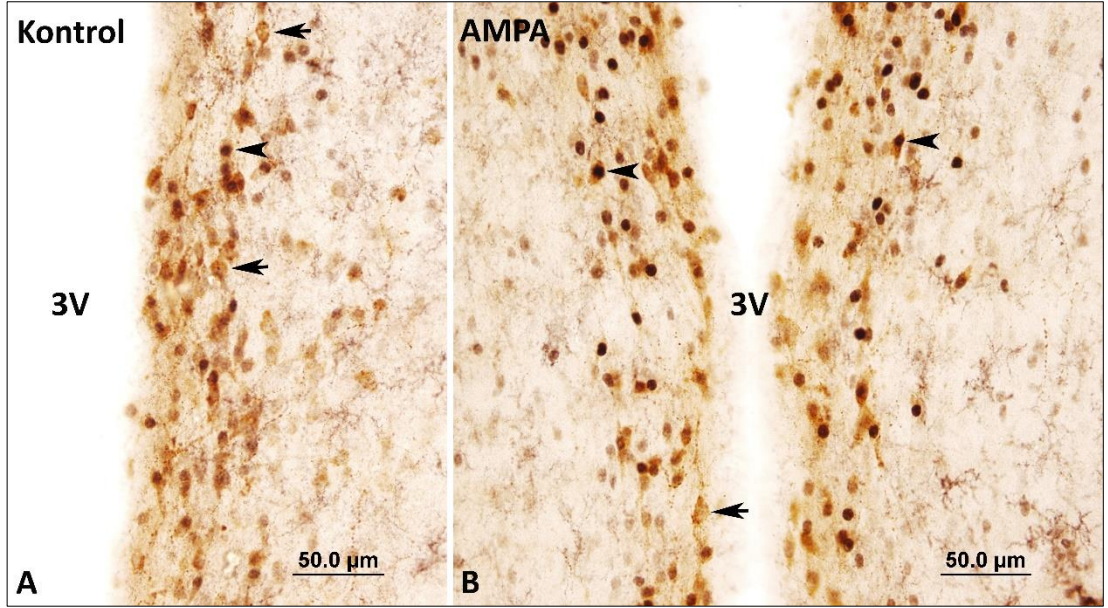
**Şekil 16.** Erkek deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (↑).



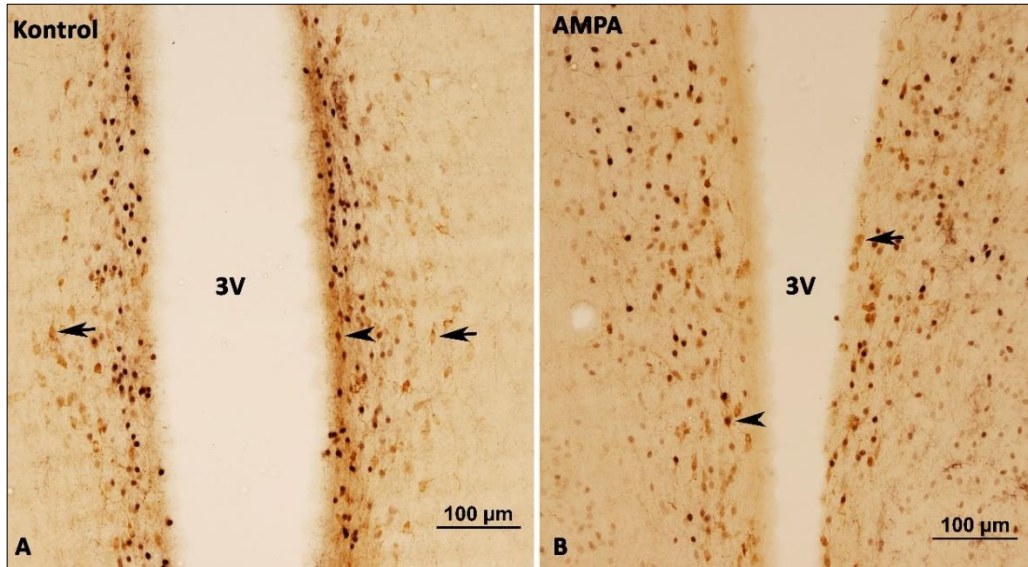
**Şekil 17.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte lokalize nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu her iki cinsiyette de, kontrol ve AMPA grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu gösterildi (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.3.2.2. AMPA ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonu

Dişi ve erkek deneklerde, AMPA enjeksiyonu sonrası hipotalamusta 3. ventrikül çevresinde anterior periventriküler nükleusta yerleşik pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının oranında kontrol grubuyla kıyaslandığında bir fark görülmedi (Şekil 18 ve 19).



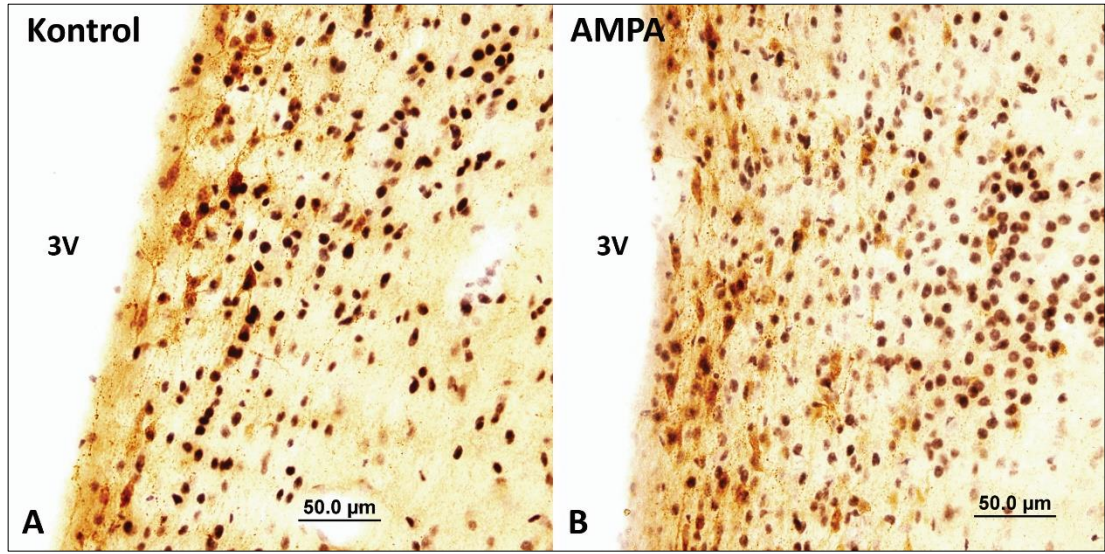
Şekil 18. Dişi deneklerde AMPA uygulamasının anterior periventriküler çekirdeğin nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. pSTAT5 proteini ekspres eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (▲).



Şekil 19. Erkek deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. pSTAT5 proteini ekspres eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (▲).

### 4.3.2.3. AMPA ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pCREB ekspresyonu

AMPA enjeksiyonu sonrası nöronostatin ve pCREB antikoları kullanılarak yapılan ikili indirekt immünohistokimyasal boyama sonucunda her iki cinsiyette de kontrol ve deney grupları arasında hem hipotalamusta fosforile-CREB immünoaktivitesinin dağılımı hem de anterior hipotalamik periventriküler nükleusta yerleşik pCREB-pozitif nöronostatin nöronlarının miktarı açısından bir fark görülmedi (Şekil 20).

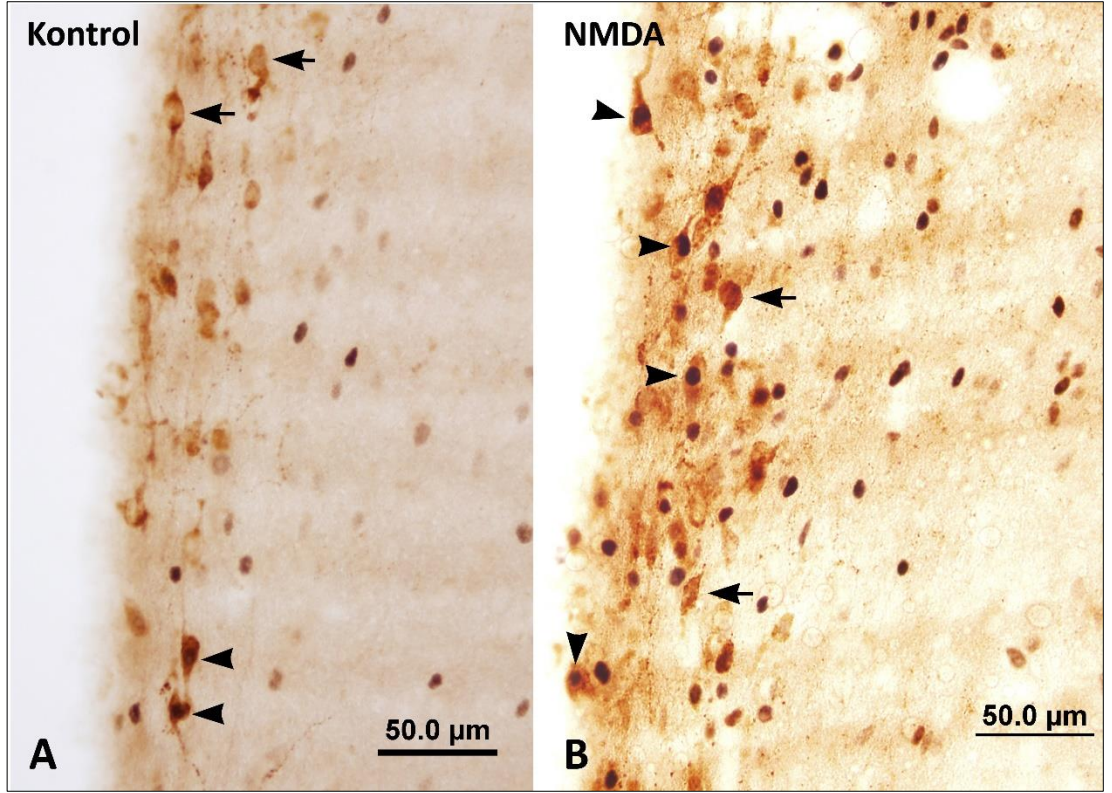


Şekil 20. Dişi deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki pCREB ekspresyonuna etkisi.

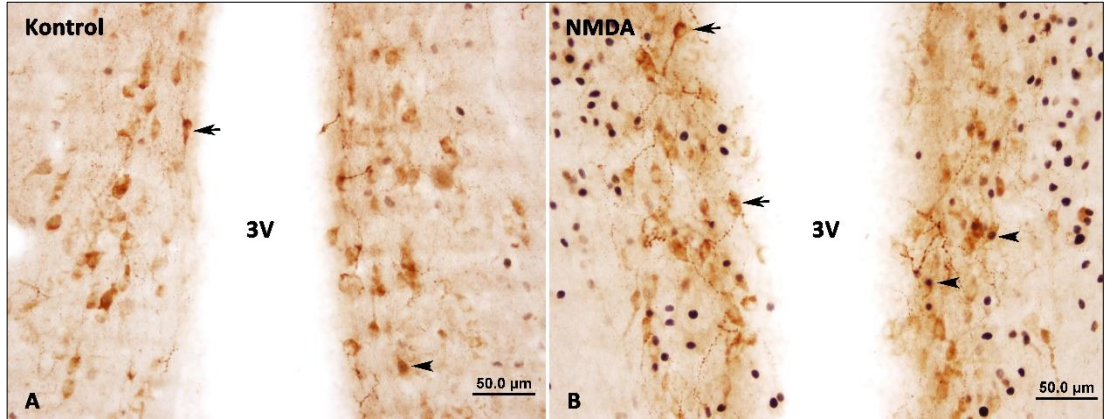
### 4.3.3. Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Agonist NMDA'nın Etkisi

#### 4.3.3.1. NMDA ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu

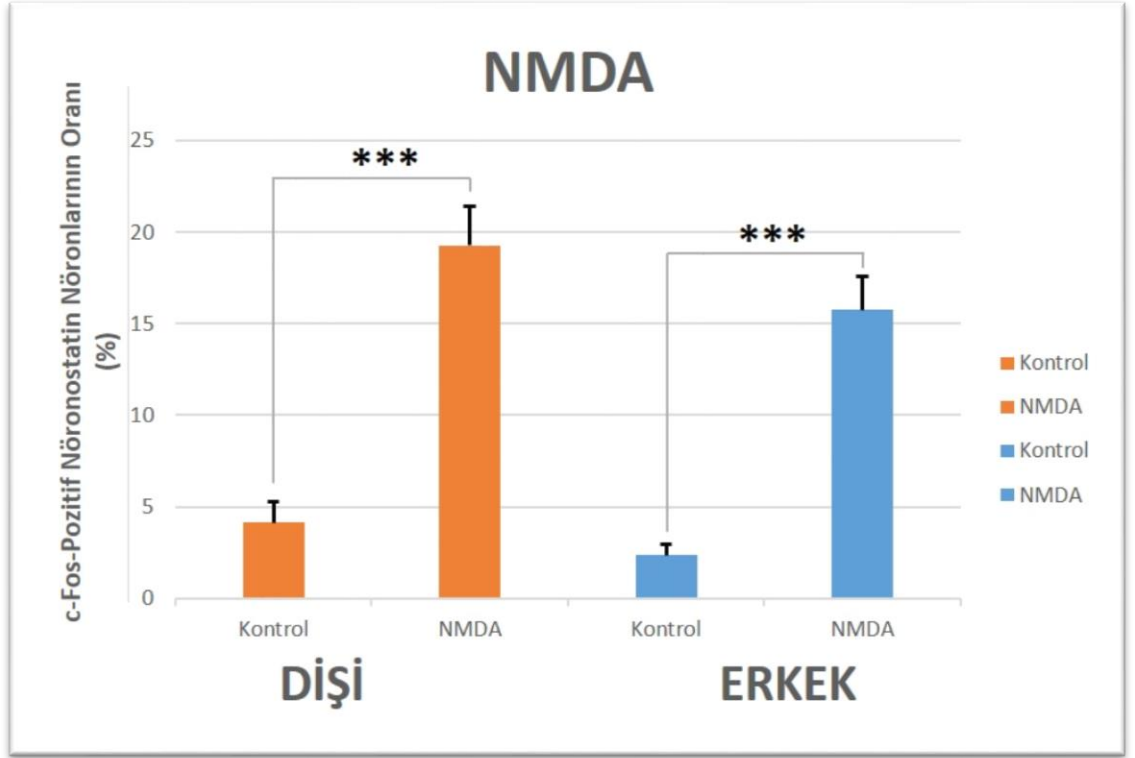
Dişi deneklerde NMDA enjeksiyonu ile hipotalamik anterior periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarının yaklaşık %19,26±2,13'ü c-Fos'u eksprese ederken; bu oran kontrol grubunda %4,13±1,40 olarak belirlendi (Şekil 21). Erkek deneklerde ise bu değerler agonist grubunda %15,74±1,80 iken; kontrol grubunda %2,37±0,58 idi (Şekil 22). c-Fos-pozitif nöronostatin nöronlarının oranında kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı bir fark belirlendi (Şekil 23) ( $p < 0,001$ ). NMDA ile aktive olan nöronostatin nöronlarının erkek ve dişi bireylerdeki farklılığının istatistiksel anlamlılık taşımadığı belirlendi.



Şekil 21. Dişi deneklerde NMDA uygulamasının anterior periventriküler çekirdeğin nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (▲).



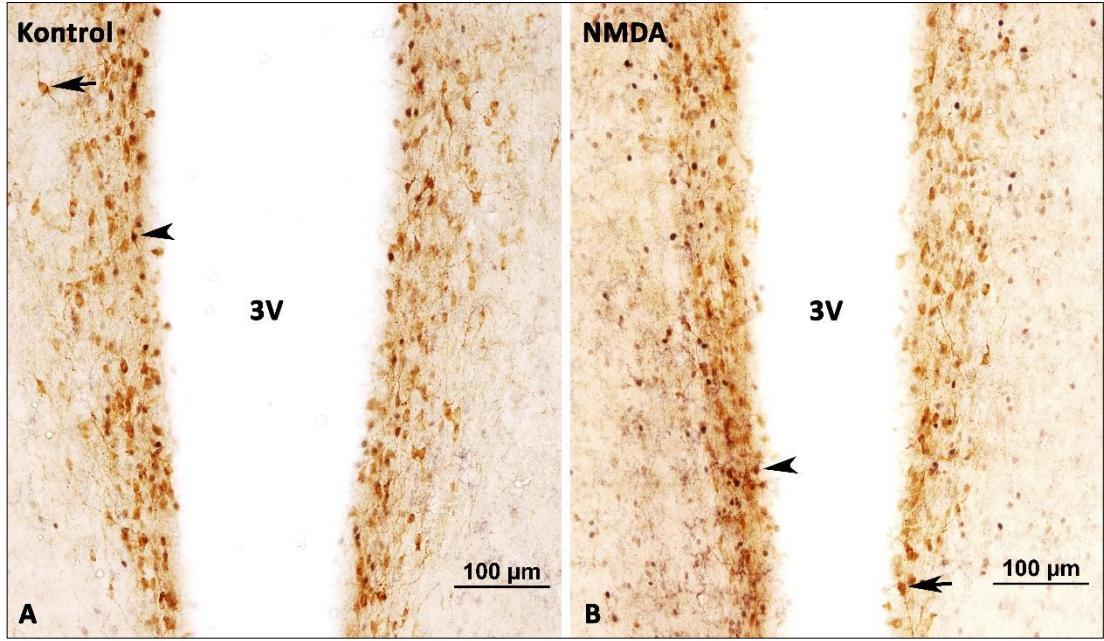
Şekil 22. Erkek deneklerde NMDA uygulamasının anterior periventriküler çekirdeğin nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (▲).



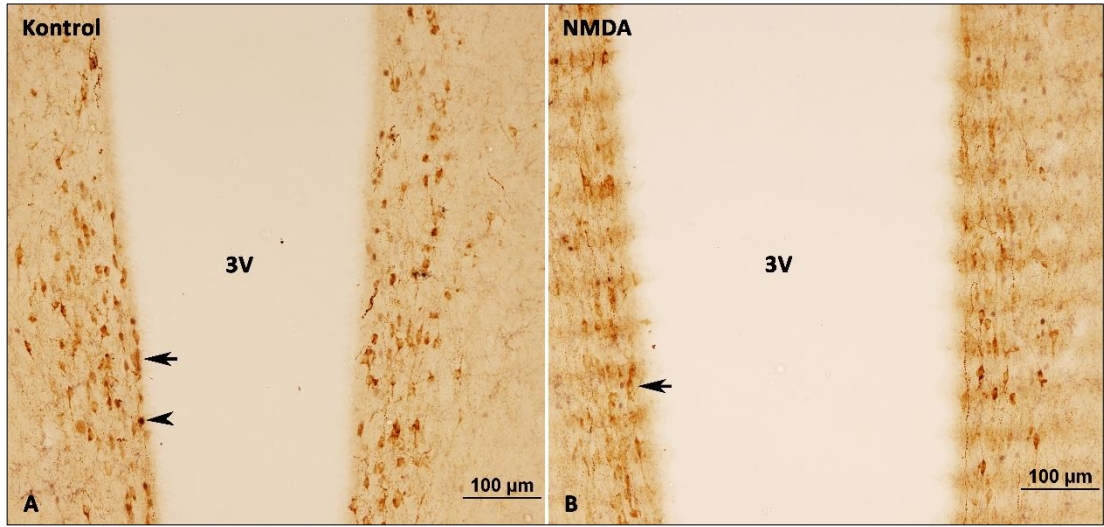
**Şekil 23.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte lokalize nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu. Her iki cinsiyette de, kontrol ve NMDA grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu gösterildi (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.3.2. NMDA ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonu

Dişi ve erkek deneklerde, NMDA enjeksiyonu sonrası hipotalamusun 3. ventrikülü çevresinde anterior periventriküler nükleusta yerleşik pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının oranında kontrol grubuyla kıyaslandığında bir fark görülmedi (Şekil 24 ve 25).



Şekil 24. NMDA uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.



Şekil 25. NMDA uygulamasının erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. pSTAT5 proteini ekspresye eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (↑).

#### 4.3.3.3. NMDA ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pCREB ekspresyonu

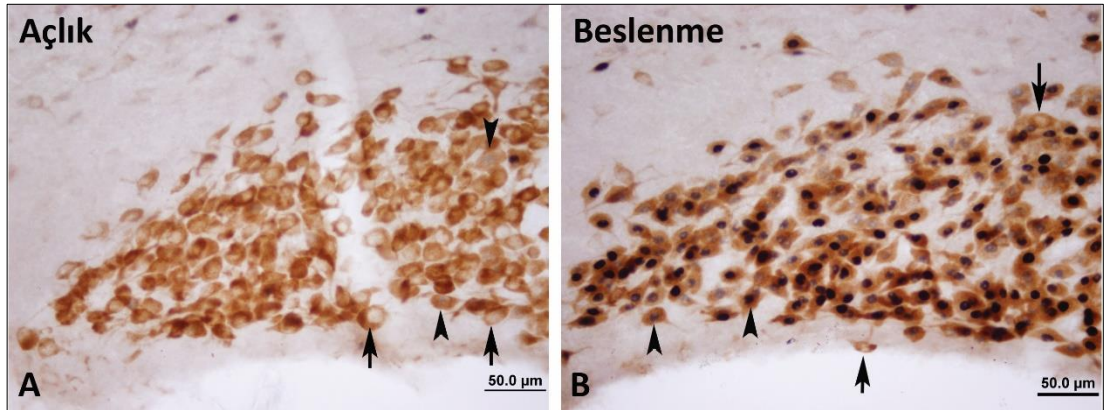
NMDA enjeksiyonu sonrası nöronostatin ve pCREB antikorları kullanılarak yapılan ikili indirekt immünohistokimyasal boyamada kainik asit ve AMPA gruplarındakilere benzer sonuç elde edildi. Kontrol ve deney grupları arasında hem pCREB-immünoreaktif hücre çekirdeklerinin hem de anterior hipotalamik



periventriküler nükleusta yerleşik pCREB eksprese eden nöronostatin nöronlarının sayısı açısından bir fark izlenmedi.

#### 4.4. Nöronostatin Nöronlarının Fizyolojik Olarak Uyarılması ve Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması

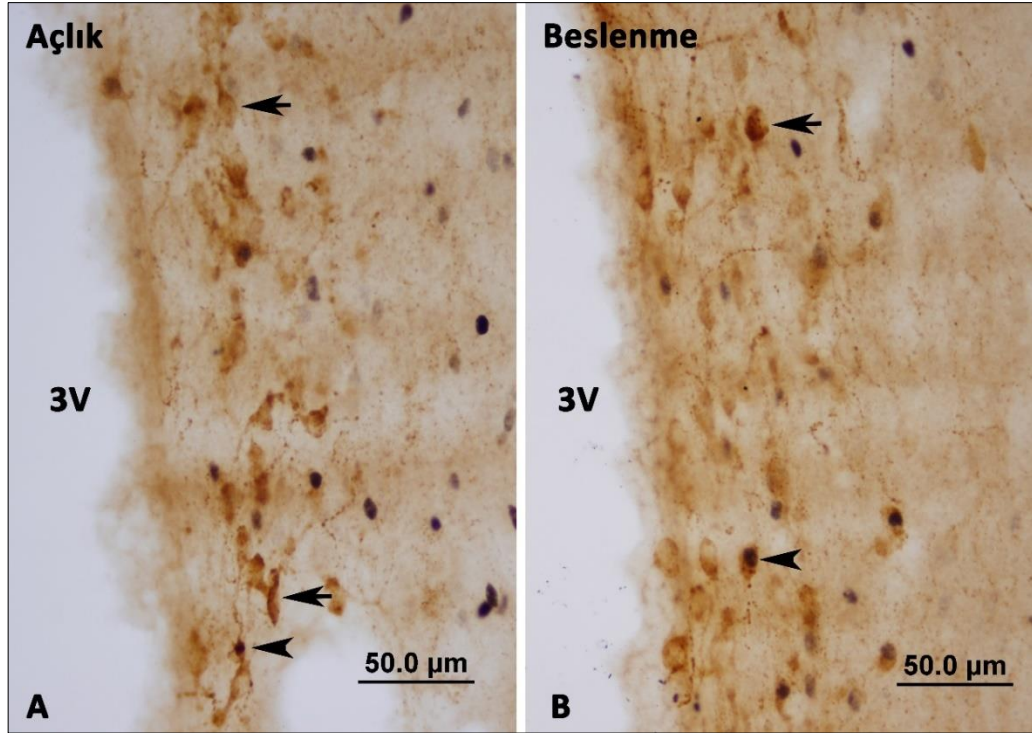
Bu gruptaki deneklerde nöronostatin nöronlarının aktivasyonunun değerlendirilmesinden önce, 48 saatlik açlığı takiben 2 saat süreyle beslenmenin, deneklerin hipotalamuslarındaki beslenme ile ilgili bölgelerde aktivasyona neden olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla, örnek kesitlerde, beslenme ile uyarıldığı bilinen diğer bir anaroksijenik peptit olan nesfatin eksprese eden nöronların aktivasyonuna bakıldı (Kohno ve ark., 2008). Aktivasyon belirteci olarak c-Fos proteini ekspresyonunun kullanıldığı immünohistokimyasal boyamalarda hipotalamik supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatinerjik nöronlardaki ikili işaretlenme değerlendirildi. Açlık gruplarında birkaç tane nesfatin nöronu c-Fos proteini için pozitifken (Şekil 26A), beslenme gruplarında nesfatinerjik nöronların yaklaşık %70-80'inin c-Fos proteini eksprese ettiği belirlendi (Şekil 26B). Beslenme gruplarında, supraoptik çekirdekteki nöronların yarısından fazlasında ikili işaretlenmenin olduğu denekler çalışmaya dahil edildi.



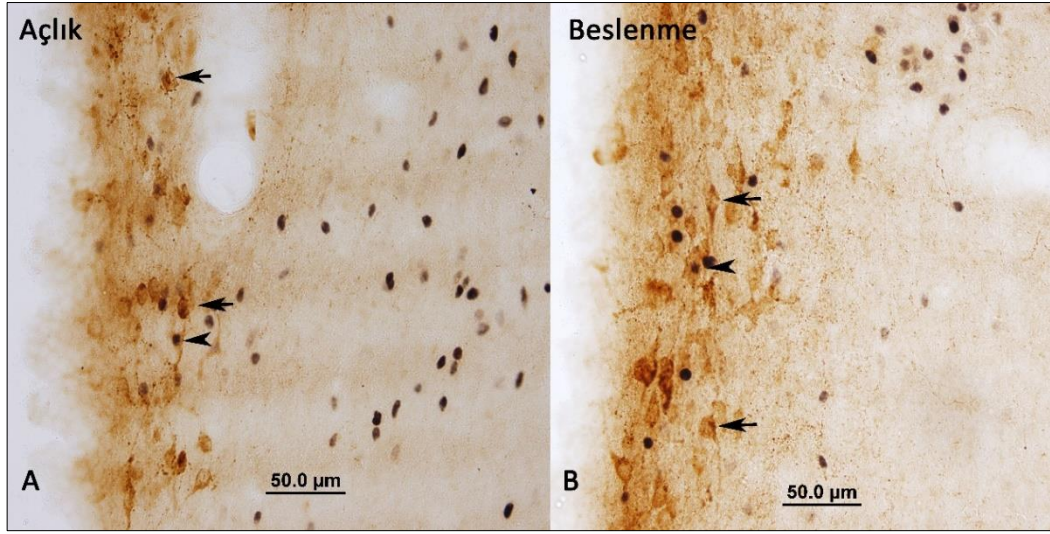
Şekil 26. Açlık (A) ve beslenme (B) gruplarında supraoptik çekirdekte c-Fos proteini eksprese eden nesfatin nöronları. c-Fos proteini eksprese eden nesfatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nesfatin nöronları (⬆).

#### 4.4.1. Beslenme ile Uyarılan Nöronostatin Nöronlarında c-Fos Ekspresyonu

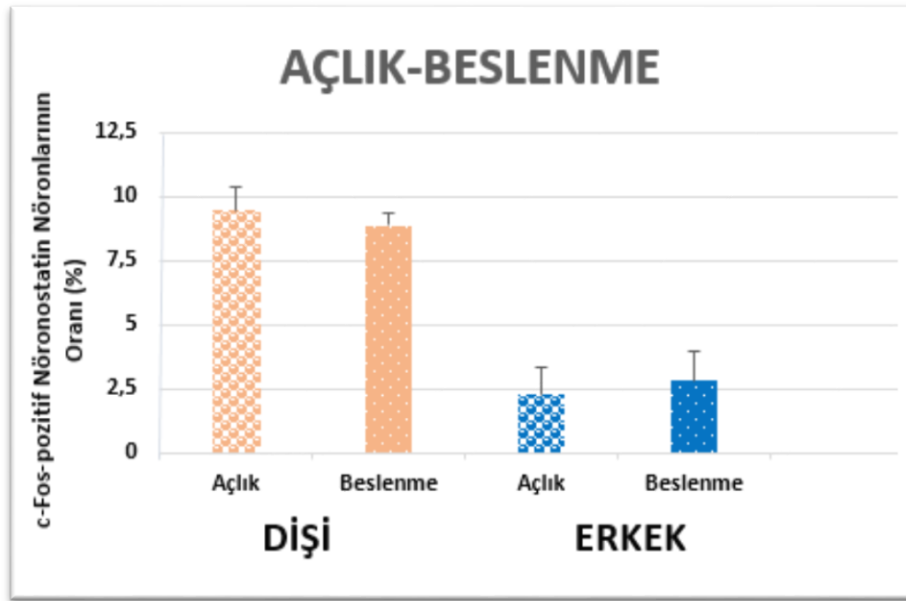
Hem dişi hem de erkek deneklerde hipotalamusun anterior periventriküler çekirdeğinde yerleşik nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu gözlemlendi. Dişi deneklerin beslenme grubunda nöronostatin nöronlarının yaklaşık  $8,89 \pm 0,47$ 'si c-Fos immünreaktivitesi gösterirken; bu oran açlık grubunda  $9,45 \pm 0,94$  idi (Şekil 27). Erkek deneklerde ise bu değerler beslenme grubunda  $2,78 \pm 1,21$ ; açlık grubunda  $2,26 \pm 1,07$  olarak belirlendi (Şekil 28). Besleme ve açlık gruplarında c-Fos ekspresyon eden nöronostatin nöronlarının oranı karşılaştırıldığında her 2 cinsiyette de anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 29). Ayrıca c-Fos ekspresyon eden nöronostatin nöronları açısından cinsiyetler arası anlamlı bir fark görülmedi.



Şekil 27. Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu. c-Fos proteini ekspresyon eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (↑).



Şekil 28. Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu. c-Fos proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve c-Fos-negatif nöronostatin nöronları (↑).



Şekil 29. Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte, beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu. Her iki cinsiyette de, beslenme ve açlık grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

#### 4.4.2. Beslenme ile Uyarılan Nöronostatin Nöronlarında pSTAT5 Ekspresyonu

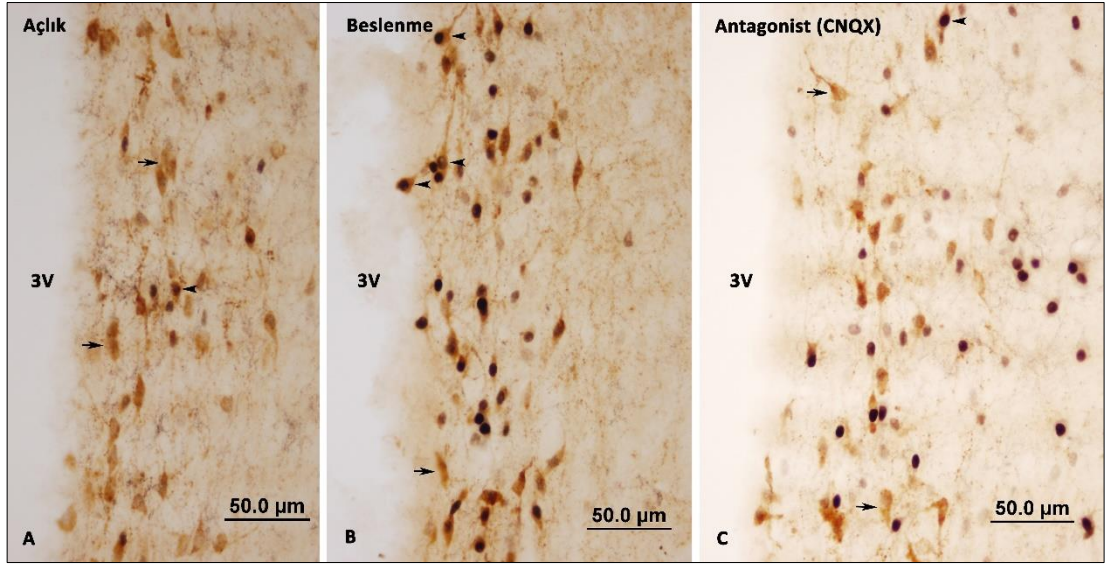
Beslenme grubunda (48 saat açlık sonrası 2 saat besleme), her 2 cinsiyette, pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronları anterior hipotalamusun periventriküler zonunda gözlemlendi. Dişi deneklerde nöronostatin nöronlarının yaklaşık % 40,31±5,22'si pSTAT5 ekspresyonu gösterirken; bu oran açlık grubunda %14,96±3,25 idi (Şekil 30). Erkek deneklerde ise bu değerler beslenme grubunda %25,56±2,52 iken

açlık grubunda  $8,18 \pm 0,87$  olarak belirlendi (Şekil 31). Her iki cinsiyette de beslenme gruplarındaki pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının oranındaki artış açlık gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bulundu (dişi deneklerde  $p < 0,01$ , erkek deneklerde  $p < 0,001$ ) (Şekil 32). Cinsiyetler arasında pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronları bakımından anlamlı bir fark gözlenmedi.

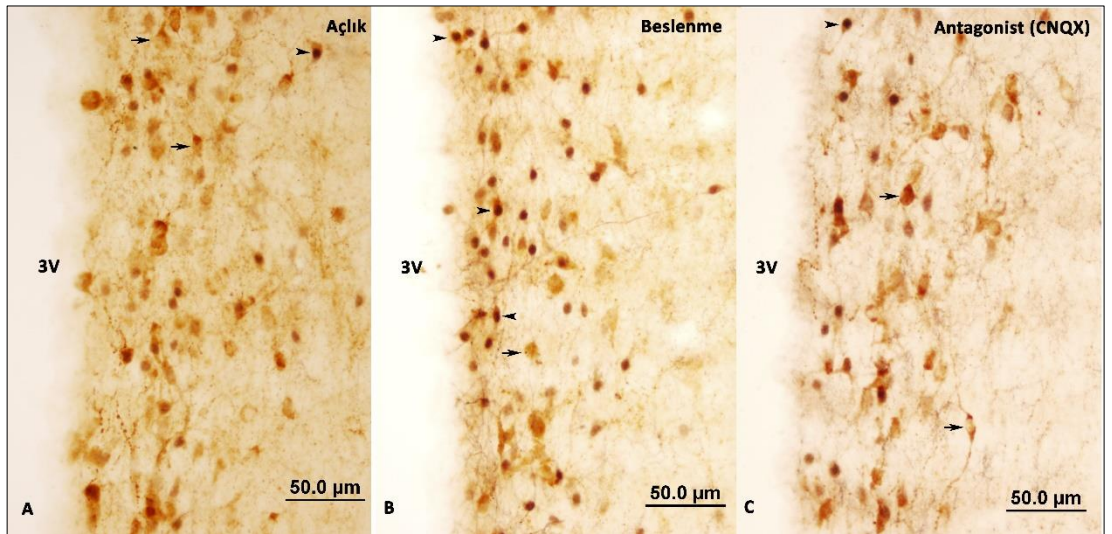
#### **4.4.3. Beslenme ile Aktive Olan Nöronostatin Nöronlarında Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması**

Beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında glutamaterjik sistemin etkilerini belirlemek amacıyla 48 saat aç bırakılan deneklere beslemeye başlamadan 15 dakika önce glutamat reseptör antagonistleri olan CNQX (1 mg/kg) ya da MK-801 (1,5 mg/kg) uygulandı.

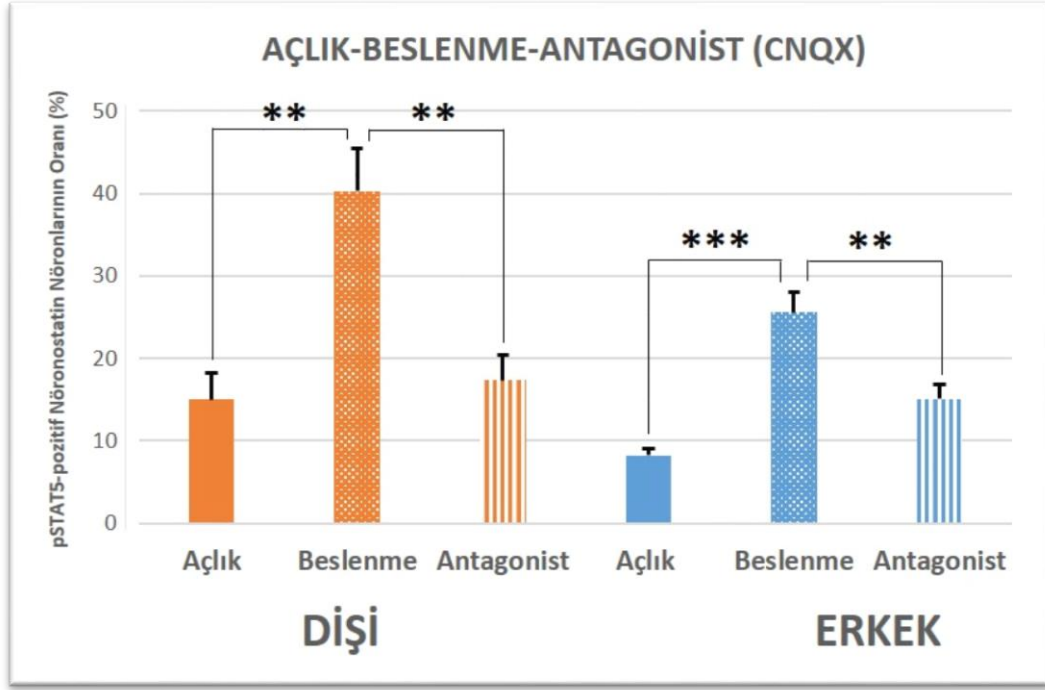
MK-801, literatür bilgilerinden (Papagapiou ve Auer, 1990) yararlanılarak uygulanan (1,5 mg/kg) dozda, deneklerin ön ve arka ekstremitelerinde paralizi oluşumuna neden oldu. Dolayısıyla beslenme davranışı gözlenmedi. Doz %50 oranında azaltılmasına karşın (0,75 mg/kg) deneklerde aynı tablo gelişti. Doz 0,20 mg/kg'a indirildiğinde paralizi tablosu gelişmedi, ancak; deneklerde yeme davranışı gözlenmedi. Kullandığımız dozlarda deney hayvanları yeme davranışı göstermediği için MK-801 uygulamasından vazgeçildi. Çalışmaya sadece non-NMDA reseptör antagonisti olan CNQX uygulamasıyla devam edildi. CNQX uygulanan grupta, pSTAT5 eksprese eden nöronostatin nöronlarının oranının dişi deneklerde  $17,33 \pm 2,98$ 'e (Şekil 30C), erkek deneklerde ise  $15,08 \pm 1,73$ 'e gerilediği gözlemlendi (Şekil 31C). Her iki cinsiyette de antagonist gruplarındaki pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının oranında azalış, beslenme gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ( $p < 0,01$ ) (Şekil 32). Cinsiyetler arasında ise pSTAT5-pozitif nöronostatin nöronlarının oranında antagonistin etkinliği açısından anlamlı bir fark gözlenmedi.



**Şekil 30.** Dişi deneklerde açlık sonrası beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında non-NMDA glutamat antagonisti olan CNQX'in etkisi. Dişi deneklerde 48 saat açlık sonrası nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonu (A), anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte besin alımı ile aktive olan nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonu (B), 48 saat açlığı takiben beslemeden 15 dk. öncesi CNQX uygulanan deneklerde anterior periventriküler çekirdekte nöronostatin nöronları (C). pSTAT5 proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (↑).



**Şekil 31.** Erkek deneklerde açlık sonrası beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında non-NMDA glutamat antagonisti olan CNQX'in etkisi. Erkek deneklerde 48 saat açlık sonrası nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonu (A), anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte besin alımı ile aktive olan nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonu (B), 48 saat açlığı takiben beslemeden 15 dk. öncesi CNQX uygulanan deneklerde anterior periventriküler çekirdekte nöronostatin nöronları (C). pSTAT5 proteini eksprese eden nöronostatin nöronları (▲) ve pSTAT5-negatif nöronostatin nöronları (↑).

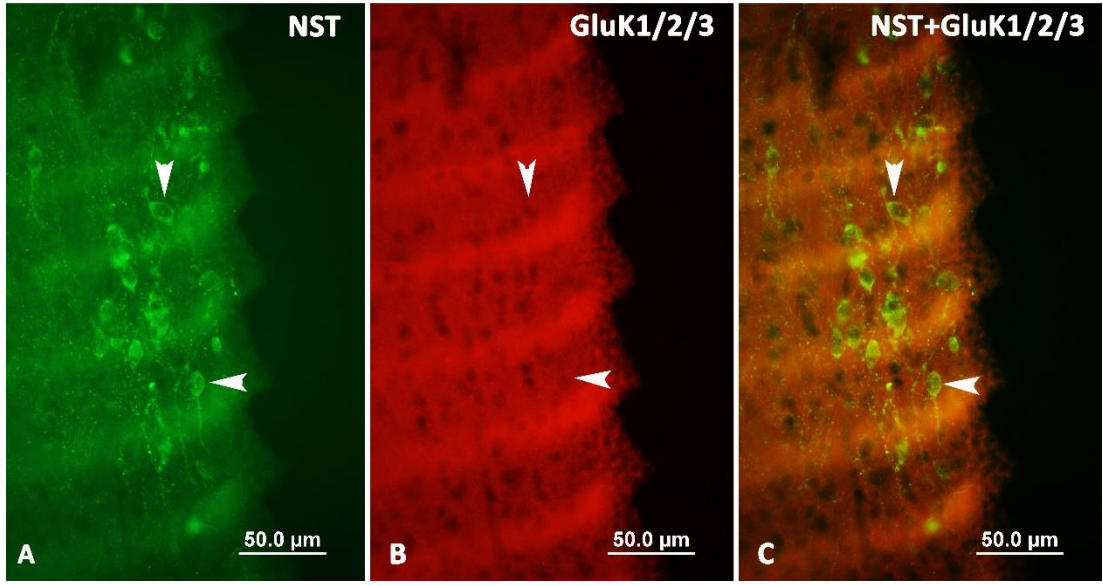


Şekil 32. Non-NMDA glutamat reseptör antagonisti CNQX'in açlık sonrası beslenme ile aktive olan nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. Her iki cinsiyette de, açlık-beslenme grupları ve beslenme-antagonist grupları arasında anlamlı farklılıklar olduğu gösterildi (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Cinsiyetler arasında ise anlamlı bir fark gözlenmedi.

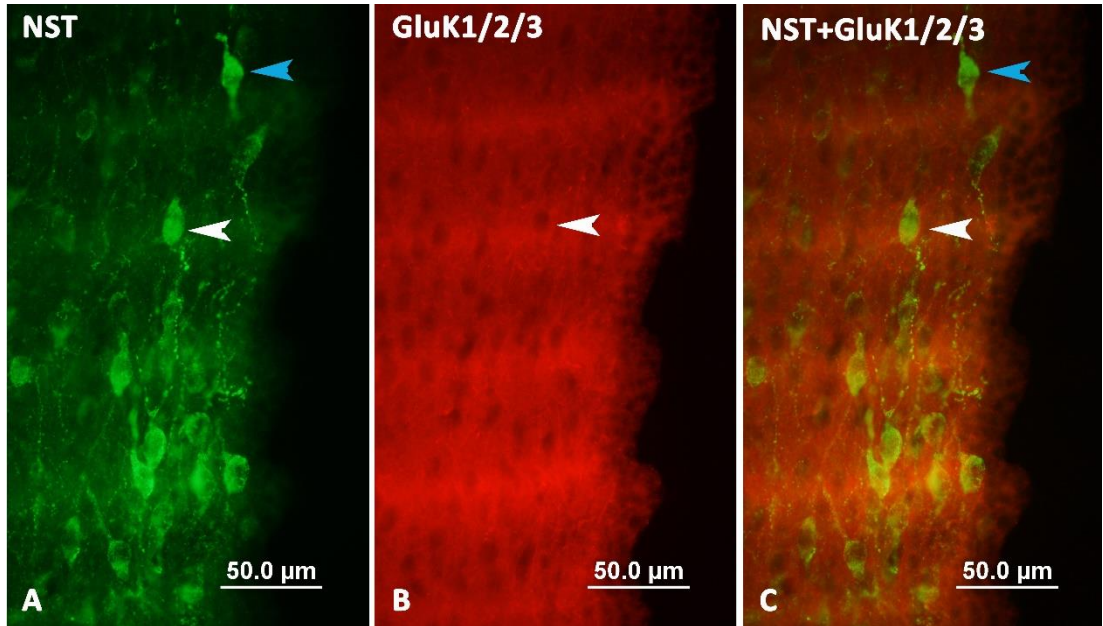
#### 4.5. Nöronostatin Nöronlarında Glutamat Reseptörlerinin Varlığı (GluK1-3 ve 5, GluA1-4, GluN1 ve GluN2A)

##### 4.5.1. Nöronostatin Nöronlarında Kainik Asit Reseptör Alt Birimlerinin Varlığının İmmüno Floresan Olarak Gösterilmesi (GluK1-3 ve GluK5)

Her iki cinsiyette de anterior hipotalamik periventriküler nükleusta yüksek afiniteli GluK1, GluK2 ve GluK3 kainat reseptörlerinin üçünü birden tanıyan antikor ile yapılan boyamalar çok az sayıda nöronostatin nöronunda bu proteinlerin eksprese edildiğini gösterdi (Şekil 33 ve 34).

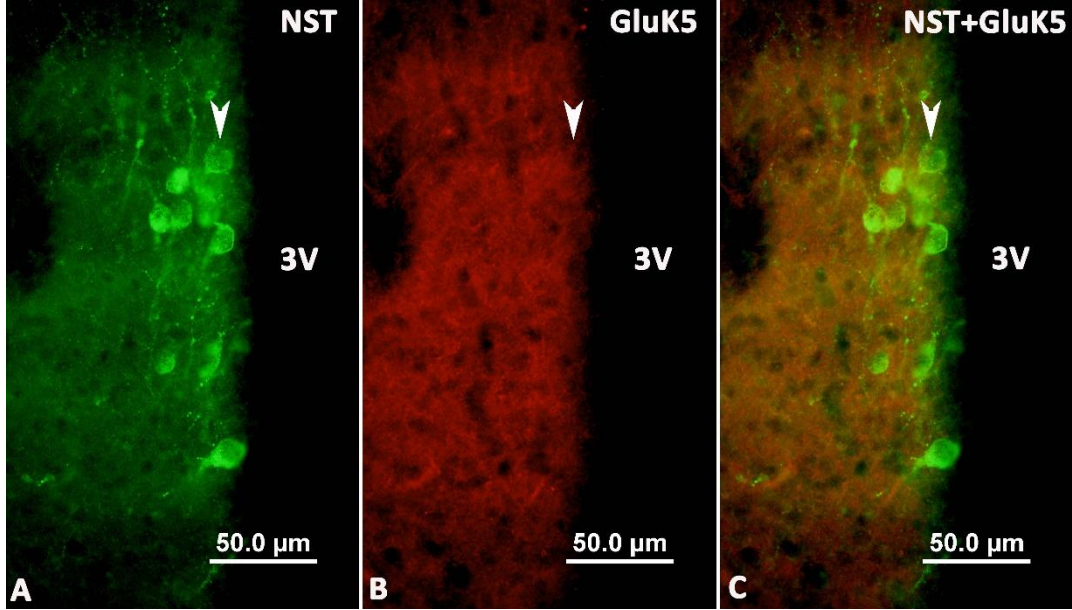


**Şekil 33.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK1/2/3-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluK1/2/3 pozitif (B), ve GluK1/2/3'ü ekspres eden nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-ekspres eden nöronlar (beyaz ok başı).

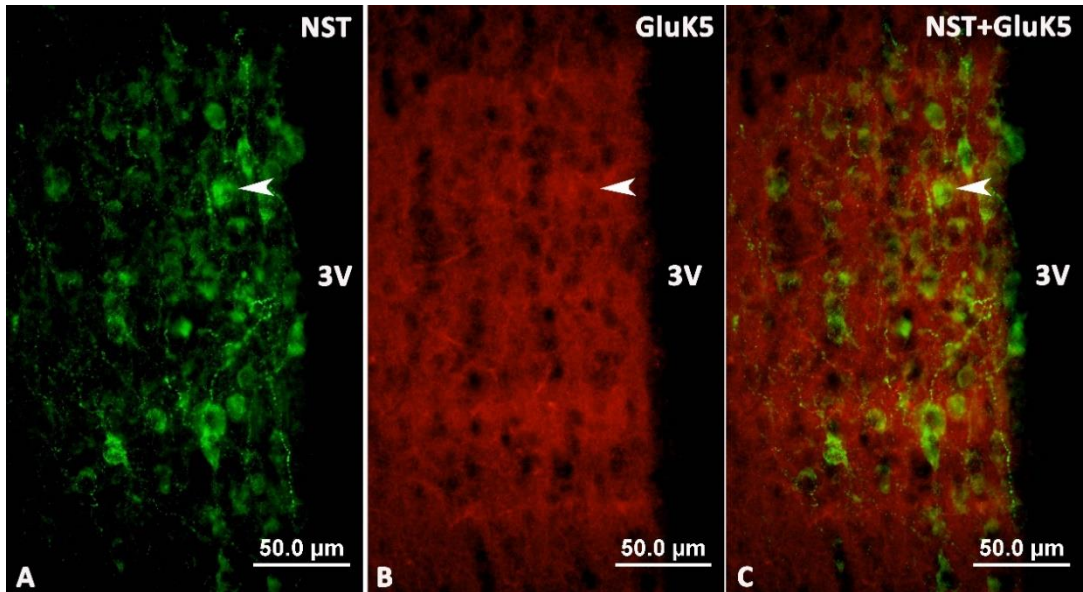


**Şekil 34.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK1/2/3-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluK1/2/3-pozitif (B) ve GluK1/2/3-pozitif NST nöronları (C). Her iki proteini ko-ekspres eden nöronlar (beyaz ok başı), sadece nöronostatin-immüno reaktif nöronlar (mavi ok başı).

İkili immüno Floresans çalışmaları, nöronostatin nöronlarının glutamat reseptörlerinin kainat reseptörü alt ailesine ait düşük afiniteli GluK5 alt birim proteinini tanıyan antikor ile işaretlendiğini gösterdi. Ancak, her iki cinsiyette de GluK5 reseptör alt birim proteinini ekspres eden nöronostatin nöronlarının çok az sayıda olduğu gözlemlendi (Şekil 35 ve 36).



Şekil 35. Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK5-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluK5-pozitif (B), ve GluK5-pozitif nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-ekspres eden nöronlar (beyaz ok başı).

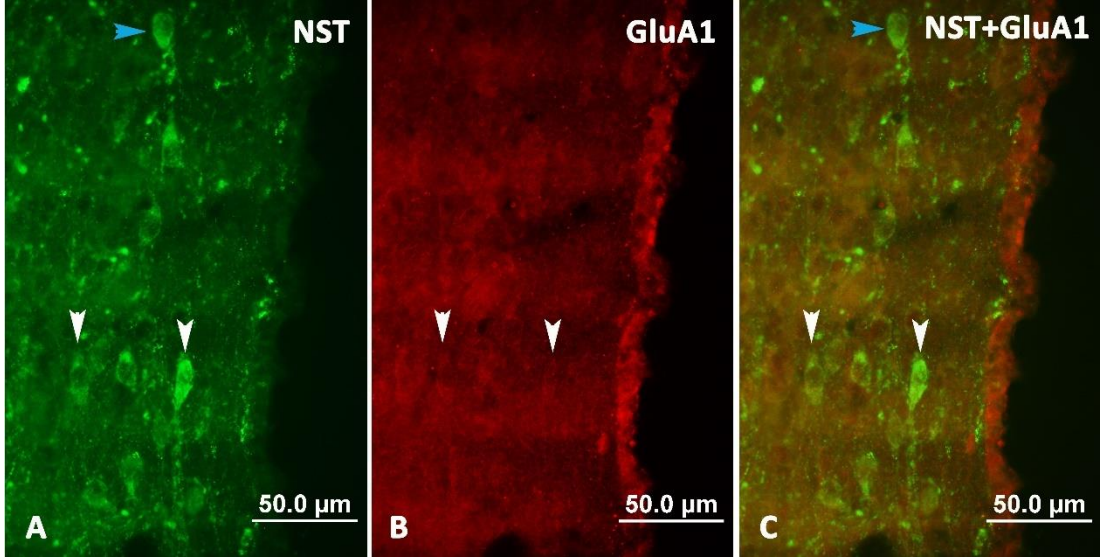


Şekil 36. Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK5-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluK5-pozitif (B), ve GluK5-pozitif nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-ekspres eden nöronlar (beyaz ok başı).

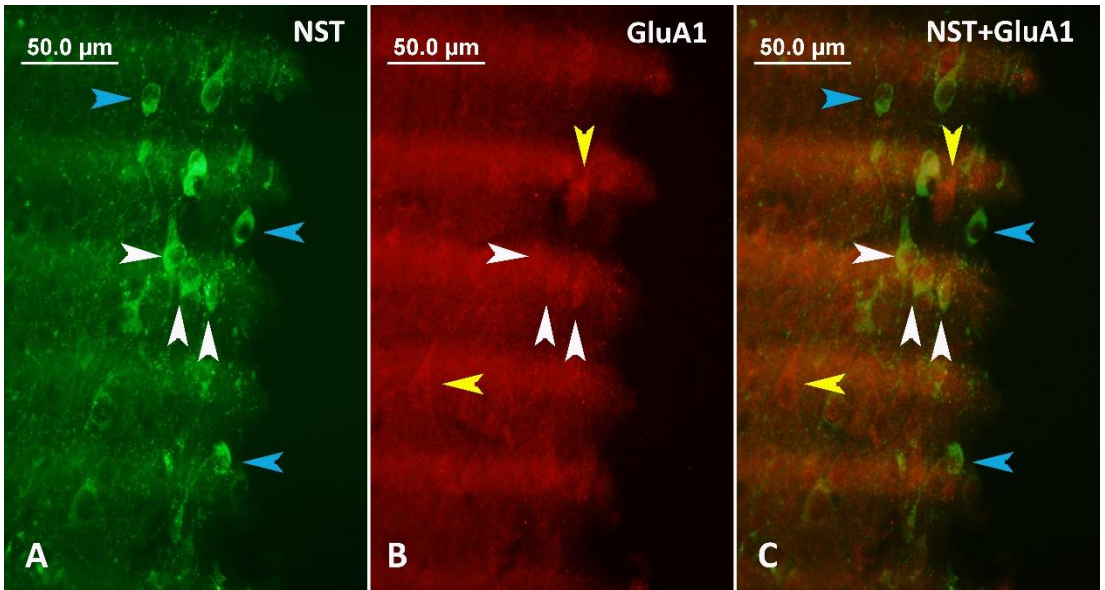


#### 4.5.2. Nöronostatin Nöronlarında AMPA Reseptör Alt Birimlerinin Varlığının İmmüno Floresan Olarak Gösterilmesi (GluA1-4)

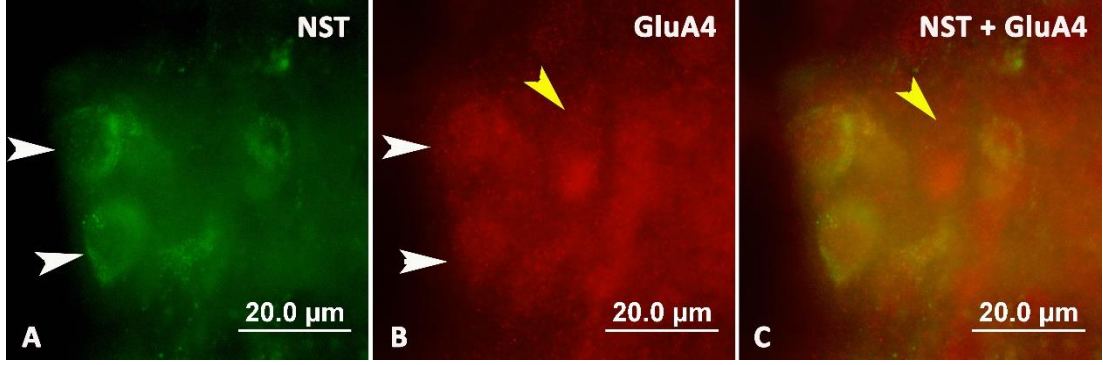
AMPA reseptör ailesinden GluA1 (Şekil 37 ve 38) ve GluA4 alt birim proteininin (Şekil 39 ve 40), nöronostatin nöronlarında ko-eksprese olduğu belirlenirken, GluA2 ve GluA3 alt birim proteinlerinin nöronostatin nöronlarında ekspresyonuna rastlanmadı.



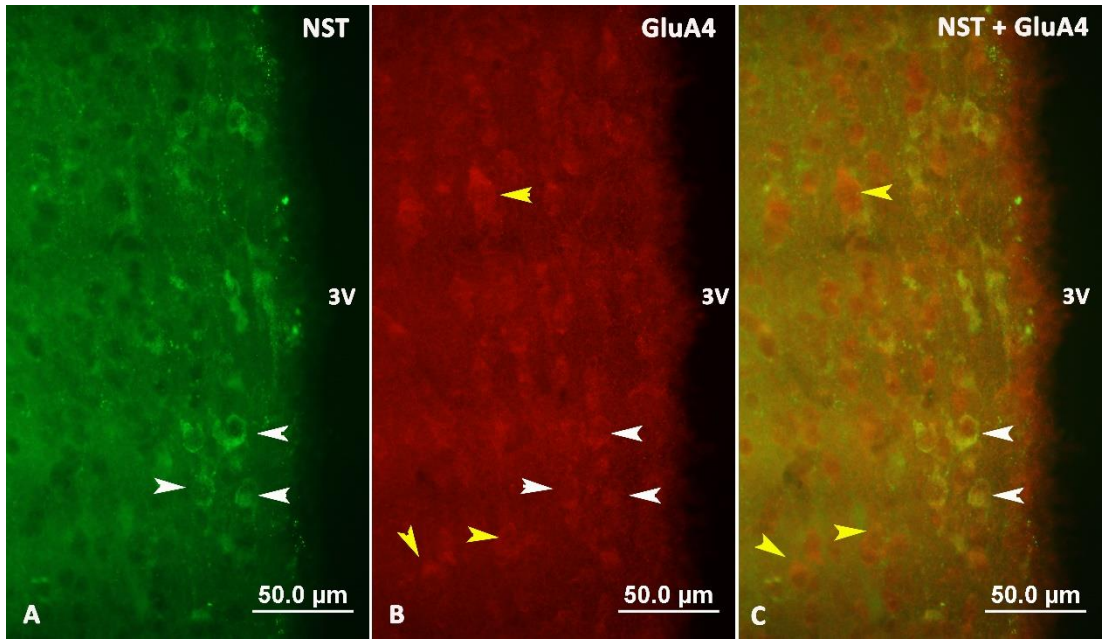
Şekil 37. Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA1-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluA1-pozitif (B) ve GluA1 eksprese eden nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-eksprese eden nöronlar (beyaz ok başı), sadece nöronostatin-immünoaktif nöronlar (mavi ok başı).



Şekil 38. Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA1-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluA1-pozitif (B) ve GluA1 eksprese eden nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-eksprese eden nöronlar (beyaz ok başı), yalnız GluA4-pozitif nöronlar (sarı ok başı), ve sadece nöronostatin-immünoaktif nöronlar (mavi ok başı).



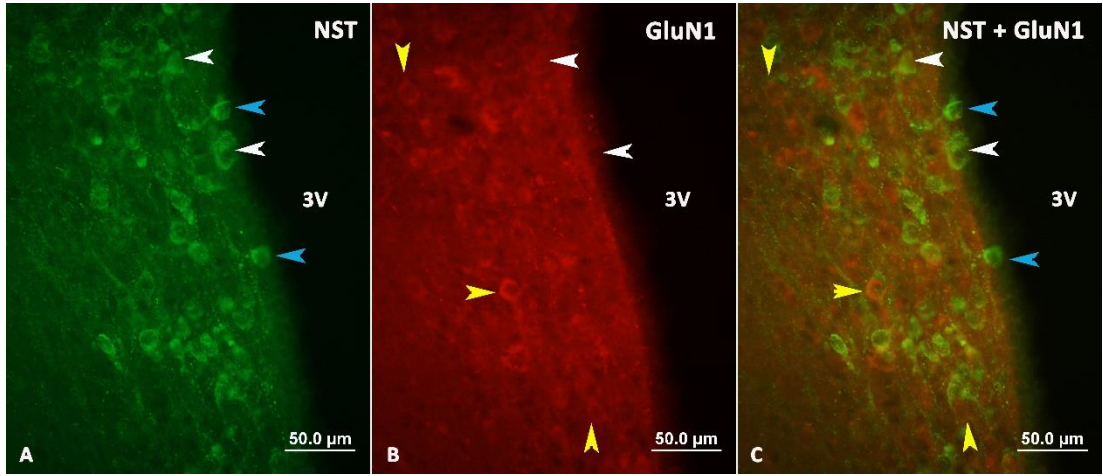
**Şekil 39.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA4-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluA4-pozitif (B) ve GluA4 eksprese eden nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-eksprese eden nöronlar (beyaz ok başı), yalnız GluA4-pozitif nöronlar (sarı ok başı).



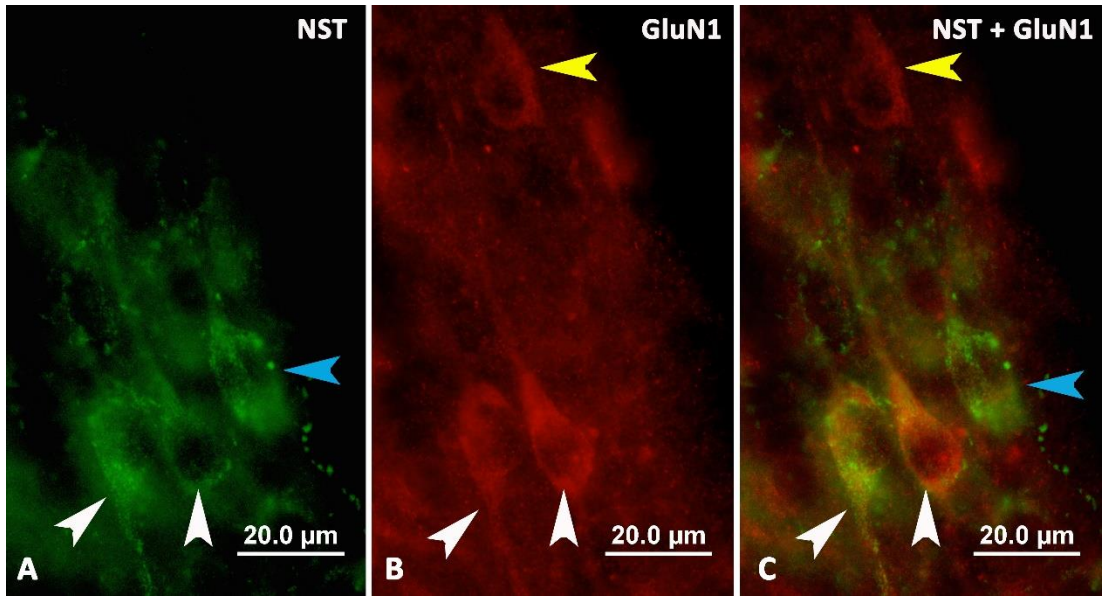
**Şekil 40.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA4-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Nöronostatin-pozitif (A), GluA4-pozitif (B) ve GluA4 eksprese eden nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-eksprese eden nöronlar (beyaz ok başı), yalnız GluA4-pozitif nöronlar (sarı ok başı).

#### 4.5.3. Nöronostatin Nöronlarında NMDA Reseptör Alt Birimlerinin Varlığının İmmüno Floresan Olarak Gösterilmesi (GluN1 ve GluN2A)

Her iki cinsiyette de anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluN1-pozitif nöronostatin nöronları gözlemlendi (Şekil 41 ve 42). Ancak; nöronostatin nöronlarında GluN2A alt birim proteini ekspresyonuna rastlanmadı.



**Şekil 41.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluN1-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. Her iki proteini ko-ekspres eden nöronlar (beyaz ok başı), yalnız GluN1-pozitif nöronlar (sarı ok başı) ve sadece nöronostatin-immünoreaktif nöronlar (mavi ok başı).



**Şekil 42.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluN1-pozitif nöronostatin nöronlarının immüno Floresan görüntüsü. nöronostatin-pozitif (A), GluN1-pozitif (B) ve GluN1 ekspres eden nöronostatin nöronları (C). Her iki proteini ko-ekspres eden nöronlar (beyaz ok başı), yalnız GluN1-pozitif nöronlar (sarı ok başı) ve sadece nöronostatin-immünoreaktif nöronlar (mavi ok başı).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sonuçları sunulan çalışma ile kurgulanan hipotez doğrulanmış ve nöronostatin nöronlarının işlevlerinin düzenlenmesinde kullanılan hücre içi yolaklar ve glutamaterjik innervasyon ile ilgili literatürde ilk olacak bulgular elde edilmiştir. Nöronostatin nöronlarının işlevlerinin düzenlenmesinde her üç tip hücre içi yolağın da (c-Fos, STAT ve CREB) kullanıldığını ve farklı sinyallerin bu yolaklar üzerinden etki ettiğini göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerin sonuçları özgün hedef sıralamasına göre aşağıda tartışılmıştır.

### **Nöronostatin Nöronlarının Hipotalamustaki Dağılımı**

Nöronostatin peptidinin hipotalamustaki ekspresyon paterni ilk olarak Dun ve ark., (2010) tarafından gösterilmiştir. Sunulan çalışmanın immünohistokimyasal sonuçları, literatür bilgisi ile uyumlu olarak, nöronostatin-immünoreaktif nöron somalarının anterior hipotalamik periventriküler çekirdek, aksonal uzantılarının median eminens, akson sonlanmalarının ise suprakiazmatik çekirdek, ventromedial hipotalamik çekirdek ve arkuat çekirdekte yerleşik olduğunu gösterdi.

### **Nöronostatin Nöronlarının Regülasyonunda Glutamaterjik Sistem Etkilerinin ve Aktivasyon Yolaklarının Araştırılması**

Nörogenesis, apoptoz, nörit gelişimi ve sinaps oluşumunu düzenleyen merkezi sinir sisteminin ana eksitator nörotransmitteri olan amino asit glutamatın hipotalamik nöroendokrin sistemler üzerindeki etkinliği yoğun olarak araştırılmaktadır (Eyigor ve ark., 2001; Eyigor ve ark., 2005; Eyigor ve ark., 2010; Meeker ve ark., 1994; Minbay ve ark., 2006 ve Van den Pol,1996). Elektrofizyolojik, moleküler ve immünohistokimya gibi çeşitli yöntemlerle glutamatın hedef doku ya da nöronlar üzerindeki etkinliği belirlenebilir. Örneğin, immünohistokimyasal yöntemle, glutamat nörotransmisyonuna özgün veziküler glutamat taşıyıcılarının varlığı hedef nöron üzerindeki akson sonlanmalarında gösterilebilir. İmmünohistokimyasal yolla

belirlenebilen diğer nörotransmisyon basamağı ise glutamat reseptör alt birimlerinin fonksiyonel iyon kanalı oluşturup oluşturamadıklarıdır. Bunu göstermek için deneklerde dışarıdan reseptör agonistleri verilir ve hedef nöronların aktive olup olmadıkları değerlendirilir. Sinir hücrelerinin aktivasyonlarını belirlemede ise c-Fos, CREB ve STAT gibi farklı nöronal aktivasyon belirteçlerinden yararlanılır (Brown ve ark., 2012; Fukushima ve ark., 2015; Ladyman ve ark., 2012 ve Severi ve ark., 2015).

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde, glutamaterjik sistemin nöronostatin nöronlarındaki etkisini araştırmak amacıyla, deneklere glutamatın iyonotropik reseptörleri üzerinden etki eden agonistleri verildi. Elde edilen sonuçlar, iyonotropik non-NMDA ve NMDA glutamat reseptörleri üzerinden etki eden agonistlerin, nöronostatin nöronlarını değişik oranlarda aktive ettiğini ve bu aktivasyonda c-Fos proteininin kullanıldığı hücre içi yolağın rol oynadığını gösterdi.

Dişi deneklerde, anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte kainik asit, AMPA ve NMDA enjeksiyonu ile c-Fos-pozitif nöronostatin nöronlarının oranının 4,5-12 kat kadar arttığı gözlemlendi. İstatistiksel değerlendirmede, bu artışların kontrol gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı olduğu belirlendi. Bazal c-Fos değerleri temel alınarak değerlendirme yapıldığında, dişilerde kainik asitin (yaklaşık 12 kat) en etkin agonist olduğu söylenebilir. Bölümümüzde gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarla da oksitosin, oreksin ve nesfatin nöronları gibi farklı nöroendokrin sistemlere glutamat agonistlerinin benzer etkileri gösterilmiştir (Eyigor ve ark., 2010; Eyigor ve ark., 2012; Eyigor ve ark., 2015 ve Minbay ve ark., 2006).

Erkek deneklerde ise nöronostatin nöronlarında aktivasyonun varlığı ve oranı agoniste göre değişiklik gösterdi. AMPA ve NMDA uygulanan deneklerden elde edilen data, kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, her iki agonistin de c-Fos pozitif nöronostatin nöronlarının sayısında anlamlı bir artışa neden olduğunu gösterdi. Buna karşın, kainik asit grubunda kontrol grubu ile kainik asit grubu arasında anlamlı bir fark belirlenmedi. Ayrıca; erkek deneklerde bazal c-Fos ekspresyonundaki, yani aktive olan nöronostatin nöronların oranındaki artışın, agonist NMDA ile yaklaşık 7 kat ve AMPA ile 2,5 kat olduğu gözlemlendi. Bu veriler, glutamatın nöronostatin nöronları üzerindeki etkisini, kainat reseptörlerinden ziyade homomerik ve/veya heteromerik fonksiyonel AMPA ve NMDA reseptörleri oluşturarak gösterdiğini ve erkek

deneklerde nöronostatin nöronlarının non-NMDA reseptör agonistlerine, NMDA'ya göre daha az tepki verdiğini düşündürdü. Bölümümüzde 2015 yılında tamamlanan bir çalışmada kısmen benzer sonuçlar elde edildi. Şöyle ki; kainik asit, AMPA ve NMDA enjekte edilen deneklerde, c-Fos pozitif nesfatin nöronlarının oranı sırasıyla %50, %78 ve %87 olarak belirlendi. Agonistler arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede kainik asit enjeksiyonu ile sağlanan aktivasyonun diğer iki agoniste göre anlamlı oranda az olduğu gözlemlendi (Eyigor ve ark., 2015). Her iki çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, kainik asit bağlayan fonksiyonel glutamat reseptörleri açısından cinsiyete bağlı farklılığın var olduğu sonucuna varıldı.

Sunulan çalışmanın bu bölümünde araştırılan diğer hücre içi yolak belirteçlerinin (CREB ve STAT5) ekspresyonlarının değişikliği ile ilgili kontrol denekleri ile agonist verilen denekler arasında bir fark gözlenmedi. Başka bir deyişle agonistlerin hiçbiri ne CREB'in ne de STAT5'in kontrol gruplarında gözlenen bazal düzeydeki fosforillenmesini değiştirmedi. Ancak, kontrol gruplarında, her iki transkripsiyon faktörünün de eksprese ediliyor olması çalışmanın konusu olan nöronlarda bu yolakların kullanıldığını ve CREB ile STAT5'i fosforilleyerek etki eden farklı sinyallerin nöronostatin nöronlarının regülasyonunda rol oynayabileceğini düşündürdü.

### **Nöronostatin Nöronlarının Fizyolojik Olarak Uyarılması ve Bu Uyarımda Glutamat Antagonistlerinin Etkinliğinin Araştırılması**

Çalışmamızın konusu olan nöronostatin peptiti, besin alımının yanı sıra sıvı alımı üzerine de baskılayıcı etki gösterir (Samson ve ark., 2008 ve Yosten ve ark., 2011). Besin alımı ve sıvı alımı, eş zamanlı gerçekleşen olaylar gibi gözükmesine karşın, birbirinden bağımsız iki davranıştır (Yosten ve Samson, 2014). Sıvı alımı, besin alımı olmadan fizyolojik koşullarda devam ederken, sıvı alımının kısıtlandığı koşullarda besin alımı gerçekleşmektedir (Zorilla ve ark., 2005). Besin alımı sırasında sıvı alımını da uyarıcı bazı stimuluslar olmasına karşın (bağırsaklarda çözünen maddelerinin emilimini takiben oluşan osmotik uyarıcılar ve katı yiyeceklerle birlikte kayganlaştırıcı etkiye sahip sıvıların alınması gerekliliği gibi), iştahı uyarıcı bütün sinyaller sıvı tüketimini etkilememektedir (Mietlicki ve ark., 2009). Ayrıca, azalmış sıvı alımının azalmış besin alımına neden olacağı düşünülmektedir (Yosten ve

Samson, 2014). Bu nedenle, peptitlerin besin ve sıvı alımı üzerindeki olası etkilerini araştıran deneyler tasarlanırken iki davranışın birbirinden ayrı değerlendirilmesi önerilmektedir (Yosten ve Samson, 2014). Her ne kadar sunulan çalışma, nöronostatini salgılayan nöronların regülasyonunda rol oynayan sinyalleri araştırmak amacıyla tasarlanmış olsa da, nöronostatin nöronlarının hem anoreksijenik hem de antidipsijenik etkiye sahip olması gibi, açlık ile uyarılmış beslenme ve/veya sıvı alımının nöronostatin nöronlarında aktivasyona neden olabileceği ön görülerek, uyarıcıları yalınlaştırmak için deneklerin suya erişimlerine ötenazilerine kadar izin verildi.

STAT5 ilk olarak Wakao ve ark. (1994), tarafından prolaktin ile uyarılmış meme bezi faktörü olarak tarif edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda STAT5'in çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin tarafından kullanılan anahtar transkripsiyon faktörü olduğu bildirilmiştir (Furigo ve ark., 2016). STAT5 yolağının besin alımı ile ilişkili hormonlar ve sitokinler (Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör [GM-CSF] gibi) tarafından aktive edildiğini gösteren çalışmalar vardır. Örneğin, Mütze ve ark. (2007), leptin uygulaması ile erkek deneklerin ARC ve SON gibi bazı hipotalamik çekirdeklerde STAT5'in fosforile olduğunu göstermişlerdir. Ladyman ve ark. (2012), leptin uygulamasının gebe deneklerde pSTAT5 immünoreaktivitesini ARC, PVN ve VMN'de kontrole göre azalttığını, buna karşın gebe olmayan deneklerde leptin ile indüklenmiş pSTAT5 immünoreaktivitesi gözlemlenemediklerini bildirmişler ve sonuçlarını leptinin belli koşullarda STAT5 aracılığıyla etki etmesinin olası olduğu şeklinde yorumlamışlardır. Lee ve ark. (2008) ise STAT5'in GM-CSF'nin anorektik etkisine aracılık ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, STAT5'in beyinde hormon kontrolüyle ilişkili olduğunu düşündüren çalışmalar da vardır. STAT5b geni hasarlanmış farelerde hiperprolaktinemi gelişmesi (Grattan ve ark., 2001) ve periventriküler nükleuslarında somatostatin mRNA seviyelerinin belirgin şekilde azalması (Bennett ve ark., 2005) bu düşüncüyü desteklemektedir. Sunulan tez çalışmanın bu bölümünde, erkek ve dişi bireylerde açlık ile uyarılmış beslenmenin, nöronostatin nöronlarının aktivasyonuna neden olduğunu ve bu aktivasyona STAT5'in fosforile olduğu hücre içi yolağın aracılık ettiği gösterildi. Bu veri, bazı nöroendokrin nöronların aktivitelerinin düzenlenmesine STAT5 yolağının aracılık ettiği düşüncesini desteklemektedir. Ayrıca, STAT5 yolağı aracılığıyla aktivitesi

düzenlenen nöron tipi açısında değerlendirildiğinde “nöronostatin- STAT5 ilişkisi” literatürde ilk olacaktır. Bu bulgu, bir önceki bölümün sonuçlarını da destekler niteliktedir. Şöyle ki, glutamaterjik sistemin nöronostatin nöronları üzerindeki düzenleyici etkisini belirlemek için kurgulanan deneyde, glutamat agonistlerinin hangi hücre içi yolak üzerinden etki ettiği, nöronal aktivasyon belirteçlerinin kullanıldığı immünohistokimyasal yöntemle gösterilmişti. Kullandığımız belirteçlerden biri olan pSTAT5 antikoruна ait immünoaktivitenin kontrol gruplarında da olması bazal koşullarda nöronostatin nöronlarında bu yolağın kullanıldığını ve olasılıkla farklı bir sinyalin STAT5 yolağı üzerinden bu nöronların aktivitesini düzenleyebileceğini düşündürmüştü. Açlık ile uyarılmış beslenmeyi takiben erkek ve dişi bireylerde açlık gruplarıyla karşılaştırıldığında belirlenen pSTAT5-immünoreaktif nöronostatin nöron sayısındaki anlamlı artış, farklı bir sinyalin, beslenme gibi STAT5’i fosforilleyerek, nöronostatin nöronlarının aktivitesini düzenleyebileceği düşüncemizi desteklemektedir.

Tez çalışmasının bu bölümünde, açlık sonrası beslenmenin neden olduğu nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonunun, glutamat reseptörü antagonisti uygulamasıyla baskılandığı da gösterildi. Hem kainik asit hem de AMPA reseptör antagonisti olarak işlev gören CNQX, anlamlı bir şekilde aktive olan nöronostatin nöronu sayısını azalttı. Bu sonuç, glutamatın nöronostatin nöronlarındaki düzenleyici etkisinin özgün olduğunu düşündürdü.

Besinlerin sindirimini takiben, ince bağırsaklardan emilen karbonhidratlar nedeniyle kan glukoz seviyesi yükselir (glisemi). Oluşan glisemi, pankreasın  $\beta$ - hücrelerinde glukoz uptake’inin artmasına ve yanıt olarak insülin salınımına neden olur. Artmış glukoz ve/veya insülin konsantrasyonu adipoz dokudan leptin salınımını tetikler. Beyne ulaşan bu sinyaller, hipotalamus ve beyin sapında NTS’de lokalize olan ve besin alımının düzenlenmesinde rol oynayan melanokortin sistemini uyarır. Hipotalamustaki melanokortin sistemi “first order” ve “second order” nöronlar olarak nitelendirilen iki nöron topluğundan oluşur (Girardet ve Butler, 2014). “First order” nöronları, besin alımını düzenleyen sinyallerin ana hedefidir ve hipotalamusun ARC’de lokalize oreksijenik nöronlar (NPY ve AgRP) ve anoreksijenik nöronlardan (POMC ve CART) oluşur. Bu nöronların aktivitesi, hipotalamusa dolaşım sistemi aracılığıyla ulaşan periferel; oreksijenik (ghrelin) ya da anoreksijenik sinyaller (leptin,



insülin, glukoz gibi) tarafından düzenlenir (Simpson ve ark., 2008). Kan beyin bariyerini aşarak ARC'deki reseptörlerine bağlanan leptin ve insülin, NPY/AgRP ve POMC/CART nöronları üzerinden anorektik etkilerini gösterirler. Her iki sinyal de POMC nöronlarını aktive ederken, NPY/AgRP nöronlarını baskılar (Enriori ve ark., 2006 ve Porte ve ark., 2005). İnsülin ve leptin tarafından aktive edilen POMC/CART nöronları, besin alımının baskılanmasına aracılık eden  $\alpha$ -MSH'yı sentezleyip salgırlar.  $\alpha$ -MSH ve AgRP'nin salınımı, melanokortin reseptörleri eksprese eden ve hipotalamusun farklı çekirdeklerinde lokalize olan "second order" nöronlarını aktive eder (Girardet ve Butler, 2014). "Second order" nöronları, MC3R ve MC4R eksprese eden nöronlardır. Farklı beyin çekirdeklerindeki MC3R ve MC4R mRNA ekspresyonlarını gösteren çalışmalar vardır (Mountjoy ve ark., 1994). MC3R'ye göre beyinde daha yaygın dağılım paternine sahip olan MC4R'lerin en yüksek oranda hipotalamusta ve beyin sapında eksprese edildiği gösterilmiştir. MC3R mRNA ekspresyonu ise özellikle hipotalamusta ve limbik yapılarda belirlenmiştir.

PVN'de lokalize oksitosin, tirotropin serbestleştirici hormon ve kortikotropin serbestleştirici hormon sentezleyen nöronlar MC4R eksprese eden "second order" nöronlardır. MC3R'ler, ARC'de lokalize POMC ve AgRP/NPY nöronlarınca eksprese edilen tek melanokortin reseptörüdür (Mounien ve ark., 2005). Bu reseptörlerin, oto-inhibitör role sahip olduğunu düşünülmektedir (Renquist ve ark. 2011).

Merkezi sinir sistemindeki melanokortin sisteminin bir diğer bölümü beyin sapında yerleşiktir. Beyin sapı, açlık ve tokluk sinyallerinin algılandığı ve cevaplandığı ikinci bir merkez olarak kabul edilir. Bu iki melanokortin sistemi arasında belirgin bir koordinasyon vardır ve birbirlerine projeksiyonlar gönderirler. Şöyle ki; beyin sapı çekirdeklerinden olan NTS'de lokalize bir grup nöron, PVN ve ARC'den inputlar alırken aynı çekirdeklere aksonlarını gönderir (Cone, 2005; Yu ve Kim 2012 ve Wang ve ark., 2015).

Beyin sapındaki NTS'de yerleşik nöronların bir kısmı, hipotalamik POMC nöronlarını aktive eden besinler ve tokluk faktörleri için alternatif bir yol oluşturur (Cone, 2005 ve Girardet ve Butler, 2014). NTS'nin kommissural bölgesinde lokalize nöronların bir kısmı POMC eksprese eder. NTS'nin hemen ventralinde yerleşik vagusun dorsal motor nükleusunda ise CART nöronları bulunur. NTS ve vagusun dorsal motor çekirdeği beyin sapında en yoğun MC4R mRNA ekspresyonun

gözlendiği çekirdeklerdir. NTS'deki nöronlar, vagal afferentler ve bağırsak peptitleri için hedef hücrelerdir. Üst gastrointestinal sistem kaynaklı üç temel sinyal tarafından mekanoreseptörler ve kemoreseptörler aracılığıyla uyarılan vagal afferentler, bu sinyalleri NTS'deki nöronlara ulaştırırlar: 1. Gastrik ve duodenal gerilme ya da kontraksiyon, 2. Lümenin kimyasal içeriği ve 3. Sindirilen besinlere yanıt olarak duodenom ve mideden salınan sindirim kanalı peptit ya da nörotransmitterleri. Gastrik ve duodenal distansiyona yanıt oluşturan afferentler NTS'nin kommissural ve medial bölümünde bulunur. Bir sindirim kanalı peptiti olan CCK uyarısını alan ve yanıtlayan vagal afferentler ise NTS'nin kaudal bölgesindedir (Cone, 2005). NTS'ye gelen bu sinyaller aksonlar aracılığıyla hipotalamusa taşınır.

Besin alımının kontrolü, literatür bilgisinden de anlaşılacağı gibi merkezi sinir sisteminde yer alan merkezlerin ve periferden gelen hormonal ve vagal afferentlerin kontrolünde olan oldukça kompleks bir mekanizmadır. Sunulan tez çalışmasında, her ne kadar açlık ile uyarılan beslenmenin nöronostatin nöronlarındaki etkisinin mekanizması araştırılmadıysa da önceki çalışmaların ışığı altında mekanizmalarla ilgili hipotezler kurgulanabilir. Beslenmenin hem hormonal hem de gastrointestinal sistemde fizyolojik bazı değişikliklere neden olduğu bilgisinden yola çıkarak "Beslenmeyi takiben kanda yükselen insülin ve leptin düzeyleri hipotalamik melanokortin sistem üzerinden nöronostatin nöronlarını uyarır" hipotezi test edilebilir. Olası diğer bir mekanizma vagal afferentler üzerinden olabilir. "Beslenmenin üst gastrointestinal sistemde neden olduğu distansiyon ve kontraksiyonlar, sinyalleri ve/veya bağırsak hormon reseptörleri taşıyan vagal afferentler aracılığıyla, beyin sapı melanokortin sistemi üzerinden nöronostatin nöronları aktive olur" hipotezini test etmek için kurgulanacak deneyler nöronostatin nöronlarının beslenme ile aktivasyonuna neden olan mekanizmaları açıklayabilir. Bazı anoreksijenik gastrointesitinal sistem peptitlerine ait reseptörlerinin periventriküler anterior hipotalamusta lokalize nöronlar tarafından eksprese edildiği bilinmektedir. "Nöronostatin nöronları beslenme sonrası gastrointestinal sistemden salgılanan bazı bağırsak peptitlerinin reseptörlerini eksprese eder" hipotezinin test edecek hedeflerin belirlenmesi beslenmenin nöronostatin nöronları üzerindeki etki mekanizmasına açıklık getirebilir.

Gonadal steroidler, memelilerde besin alımını etkileyen pek çok faktörden biridir (Butera, 2010). Bu etki özellikle dişi bireylerde gözlenmektedir. Ovariyektomi yapılan erişkin sıçanlarda besin alımı ve öğün miktarının dolayısıyla vücut ağırlığının artması ovarian siklus sırasında besin alımı davranışının değişmesinden sorumlu olan hormonun östradiol olduğunu göstermektedir (Asarian ve Geary, 2002). Dişi sıçanlarda 4-5 günlük östrus siklusünde besin alımında siklik değişiklikler gözlenmektedir. Siklusün diğer aşamaları ile karşılaştırıldığında, LH yükselmesini takip eden akşam besin alımı %25 kadar azalmaktadır (Asarian ve Geary, 2006). Besin alımındaki bu azalma, besin miktarının azalmasının sonucu olduğu bildirilmektedir (Butera, 2010). Yemek yeme davranışı ile ilgili bir diğer fark ise beslenme süresinin dişilerde daha kısa olmasıdır (Fukushima ve ark., 2015).

Hipotalamusta besin alımını düzenleyen nöroendokrin nöron gruplarından biri olan oreksin nöronlarının sıçanlarda açlık cevabında cinsiyetler arasında fark olduğu gösterilmiştir. Funabashi ve ark. (2009), siklusunun herhangi bir gününde olan dişi deneklerde oreksin nöronlarının açlığa CREB'i fosforilleyerek yanıt verdiğini, erkek bireylerde ise pCREB-immünoreaktivitesi olmadığını bildirmişlerdir. Cinsiyete göre aktivasyonu farklılık gösteren diğer bir nöroendokrin nöron grubunun da MCH nöronları olduğu bildirilmiştir. Mogi ve ark., (2005), 48 saatlik açlığın her iki cinsiyette de MCH nöronlarını aktive ettiğini, ancak; glukoz enjeksiyonunu takiben gözlenen pCREB-pozitif MCH nöron sayısındaki azalmanın, sadece dişi deneklerde ve siklusün evrelerinden etkilenmeksizin anlamlı olduğunu göstermişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında, dişi denekler, siklus evreleriyle ilişkilendirilmeden kullanıldı. Buna karşın, elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi, siklus evrelerinin tez çalışmasının sonuçlarında dramatik bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi.

### **Nöronostatin nöronlarında glutamat reseptörlerinin varlığı (GluK1-3 ve 5, GluA1-4, GluN1 ve GluN2A)**

Sunulan çalışmanın çıktıları, hem NMDA hem de non-NMDA glutamat reseptör proteinlerinden bir kısmının nöronostatin nöronlarıncaya sentezlendiğini gösterdi. Nöronostatin nöronlarında GluA1, GluA4, GluK1/2/3, GluK5 ve GluN1

reseptör proteinlerinin eksprese edildikleri belirlenirken, GluA2, GluA3 ve GluN2A proteinlerinin varlığını gösteren immünoaktiviteye rastlanmadı.

Glutamat reseptörlerinin merkezi sinir sistemi ve hipotalamustaki dağılımlarını mRNA ve protein düzeylerinde gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Eyigor ve ark., 2001, Eyigor ve ark., 2005; Martin ve ark., 1993; Petralia ve Wenthold., 1992; Petralia ve ark., 1994 ve Sato ve ark., 1993). İmmünohistokimya ve in situ hibridizasyon çalışmaları ile anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte AMPA reseptör ailesinden GluA1 ve GluA2 mRNA ve proteinlerinin orta-yüksek yoğunlukta, buna karşın; GluA3 ve GluA4 için düşük yoğunlukta eksprese edildiği bildirilmiştir (Martin ve ark., 1993 ve Sato ve ark., 1993). Başka bir in situ hibridizasyon çalışmasında, aynı bölgede kainat reseptör alt birimlerinin mRNA düzeyinde varlıkları belirlenmiş ve GluK5'in yüksek ve diğer alt birimlerin (GluK1, GluK2 ve GluK3) düşük-orta yoğunlukta eksprese edildikleri gösterilmiştir (Eyigor ve ark., 2001). Aynı çalışmada NMDA reseptör alt birimlerinin mRNA sinyalleri de belirlenmiş ve en yoğun sinyal GluN2A'ye ait olduğu gösterilmiştir. mRNA sinyallerinin GluN1, GluN2B ve GluN2D alt birimleri için orta, GluN2C için ise düşük yoğunlukta olduğu bildirilmiştir (Eyigor ve ark., 2001). Sunulan çalışmada ikili floresan boyama ile elde ettiğimiz sonuçlar, önceki çalışmalarda anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte belirlenen NMDA ve non-NMDA glutamat reseptör sinyallerinin bir kısmının nöronostatin nöronlarına ait olduğunu düşündürmüştür.

Glutamat reseptör alt birimleri bir araya gelerek fonksiyonel reseptör kompleksleri oluştururlar. Bu reseptör kompleksleri homomerik ya da heteromerik yapıda olabilir. Aynı alt birimlerin bir araya gelmesiyle homomerik, farklı alt birimlerin bir araya gelmesi ile de heteromerik fonksiyonel iyon kanalları oluşur (Kumar ve ark., 2011; Mayer, 2016 ve Herguedas ve ark., 2016).

Sunulan çalışma, nöronostatin nöronlarının kainat reseptör ailesine ait hem düşük afiniteli hem de yüksek afiniteli reseptör alt birim proteinlerini eksprese ettiklerini gösterdi. Bu sonuçlar bize nöronostatin nöronlarında eksprese edilen kainat reseptör proteinleri ile ilgili iki şey düşündürdü: 1. Tek başına kanal oluşturamayan GluK5 alt birimi; GluK1, GluK2 ya da GluK3 alt birimlerinden biri ile bir araya gelerek fonksiyonel heteromerik kainat reseptör kompleksi oluşturabilir. 2. Düşük

affiniteli kainat reseptör alt birimleri olan GluK1, GluK2 ya da GluK3 fonksiyonel homomerik kainat reseptör kompleksi oluşturabilir.

AMPA reseptör kompleksleri homomerik iyon kanalları olabilecekleri gibi, büyük çoğunlukla heteromerler şeklinde bulunurlar (Herguedas ve ark., 2016 ve Mayer, 2016). Tersine NMDA reseptör alt birimleri yalnızca heteromer yapısında fonksiyonel reseptör kompleksleri oluşturabilir (Paoletti, 2011). NMDA reseptör komplekslerinin zorunlu alt birimi GluN1'dir (Kumar ve ark., 2011). Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar, glutamatın nöronostatin nöronları üzerindeki aktive edici etkisine kainat reseptörleri ile birlikte AMPA-seçici iyonotropik glutamat reseptörlerinin de aracılık ettiğini gösterdi. Nöronostatin nöronlarında ekprese edildiği belirlenen GluA1 ve GluA4 alt birimlerinin kendi başlarına ya da birlikte fonksiyonel katyon kanalları oluşturdukları düşünüldü. Tez çalışması kapsamında araştırılan NMDA reseptör alt birim proteinlerinden GluN1'in nöronostatin nöronlarında ekprese olduğu gözlemlendi. GluN2A immünüreaktivitesi nöronostatin nöronlarında belirlenmemesine karşın, yine de bu nöronların fonksiyonel NMDA-seçici glutamat reseptörleri taşıdıkları düşünüldü. Çünkü; 1. Nöronostatin nöronlarında NMDA reseptör komplekslerinin olmazsa olmaz alt birimi GluN1'in ekspresyonu pozitif. 2. Nöronostatin nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistem etkilerinin araştırıldığı bölümde, dişi ve erkek deneklerin nöronostatin nöronları NMDA uyarısına istatistiksel anlamlılık taşıyan artmış c-Fos ekspresyonu ile yanıt verdiler. 3. GluN1 alt birimi, GluN2'nin diğer tipleri ile de fonksiyonel reseptör kanalları oluşturur. Sunulan çalışmada, GluN2B, GluN2C ve GluN2D'nin nöronostatin nöronlarındaki ekspresyonu araştırılmadı. Yine de; GluN2B, C ve D reseptör tiplerinin anterior hipotalamik periventriküler çekirdekteki varlığı, aynı bölgede lokalize nöronostatin nöronlarının bu reseptör tiplerini ekprese edebileceklerini, dolayısıyla glutamat tarafından NMDA reseptörleri aracılığıyla regüle edilebileceği olasılığını taşımaktadır.

Sunulan çalışmayla nöronostatin nöronlarının regülasyonu ile ilgili literatürde ilk olacak pek çok yeni data elde edilmiştir:

1. Nöronostatin nöronlarının aktivitesinin düzenlenmesinde glutamaterjik sistem direkt rol oynar.
2. Nöronostatin nöronlarının aktivasyonunda c-Fos proteininin eksprese edildiği, CREB ve STAT5 proteinlerinin fosforillendiği hücre içi aktivasyon yolları kullanılır.
3. Farklı sinyal molekülleri, nöronostatin nöronlarında farklı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonuna neden olur.
4. Nöronostatin nöronlarında eksprese edilen fonksiyonel katyon kanallarının tipleri ve etkinlikleri dişi ve erkek bireyler arasında farklılık gösterir.
5. Nöronostatin nöronları, açlık sonrası beslenme ile STAT5 proteininin fosforillendiği hücre içi yolak ile aktive olur.
6. Nöronostatin nöronlarının açlık sonrası beslenme ile aktivasyonu glutamat reseptör antagonistleri ile baskılanır.
7. Nöronostatin nöronları, homomerik ya da heteromerik fonksiyonel reseptör kompleksleri oluşturabilecek glutamat reseptör alt birimlerinin bir kısmını eksprese eder.

Bu bulguların ışığı altında, besin alımının baskılanmasında etkin bir peptid olan nöronostatini sentezleyen nöronların fonksiyonlarının düzenlenmesinde, besin alımı gibi periferik sinyallerin ve nörotransmitter glutamat gibi santral sinyallerin rol oynadığı ve glutamatın etkinliğini NMDA ve non-NMDA reseptörleri aracılığıyla gösterdiği sonucuna varıldı.

## 6. KAYNAKLAR

Aja S, Sahandy S, Ladenheim EE et al (2001) Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281: 1862-1867.

Altarejos JY, Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 141-151.

Amato A, Baldassano S, Gaetano C et al (2015) Neuronostatin: Peripheral site of action in mouse stomach. *Peptides* 64: 8-13.

Anderson EJ, Çakır I, Carrington SJ et al (2016) 60 years of POMC: Regulation of feeding and energy homeostasis by  $\alpha$ -MSH. *Journal of Molecular Endocrinology* 56: 157-174.

Arletti R, Benelli A, Bertolini A (1989) Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides* 10: 89-93.

Asarian L, Geary N (2002) Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and Behaviors* 42: 461-471.

Asarian L, Geary N (2006) Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 361: 1251-1263.

Asin KE, Gore Jr. PA, Bednarz L et al (1992) Effects of selective CCK receptor agonists on food intake after central or peripheral administration in rats. *Brain Research* 571: 169-174.

Bai FL, Yamano M, Shiotani Y et al (1985) An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Research* 331: 172-175.

Balazs R (2006) Trophic effect of glutamate. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 6: 961-968.

Bellinger LL, Bernardis LL (1999) Effect of dorsomedial hypothalamic nuclei knife cuts on ingestive behavior. *The American Journal of Physiology* 276: 1772-1779.

Bennett E, McGuinness L, Gevers EF et al (2005) Hypothalamic STAT proteins: regulation of somatostatin neurones by growth hormone via STAT5b. *Journal of Neuroendocrinology* 17: 186-194.

Bernardis LL, Benedict MR, Deziel MR et al (1996) Increased plasma IGF-1 levels but lack of changes in adipocyte glucose transport in weanling rats with dorsomedial hypothalamic nucleus lesions 1 year after lesion production. *Physiology & Behavior* 59: 689-697.

Bigge CF (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Current Opinion in Chemical Biology* 3: 441-447.

Bleakman D, Gates MR, Ogden AM, et al (2002) Kainate receptor agonists, antagonists and allosteric modulators. *Current Pharmaceutical Design* 8: 873-885.

Boorse GJ, Denver RJ (2006) Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General Comparative and Endocrinology* 146: 9-18.

Brann DW (1995) Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61: 213-225.

Brann DW, Mahesh VB (1994) Excitatory amino acids: Function and significance in reproduction and neuroendocrine regulation. *Frontiers Neuroendocrinology* 15: 3-49.

Broberger C, Johansen J, Johansson C et al (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 15043-15048.

Bromberg J, Darnell JE (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19: 2468-2473.

Brown RE, Piet R, Herbison AE (2012) Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* 153: 2375-2384.

Brown RE, Wilkinson M (1994) *An Introduction to Neuroendocrinology*. 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp: 120-124.

Butera (2010) Estradiol and the control of food intake. *Physiology & Behavior* 99: 175-180.

Butler AA, Kesterson RA, Khong K et al (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141: 3518-3521.

Campos CA, Ritter RC (2015) NMDA-type glutamate receptors participate in reduction of food intake following hindbrain melanocortin receptor activation. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308: 1-9.



- Campos CA, Wright JS, Czaja K et al (2012) CCK-induced reduction of food intake and hindbrain MAPK signaling are mediated by NMDA receptor activation. *Endocrinology* 153: 2633-2646.
- Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends in Neuroscience* 28: 436-445.
- Carlini VP, Ghersi M, Gabach L et al (2011) Hippocampal effects of neuronostatin on memory, anxiety-like behavior and food intake in rats. *Neuroscience* 197: 145-152.
- Chometton S, Croizier S, Fellmann D et al (2016) The MCH neuron population as a model for the development and evolution of the lateral and dorsal hypothalamus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 75: 28-31.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J et al (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience* 8: 571-578.
- Cone RD (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine Reviews* 27: 736-749.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA et al (2001) The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 5: 63-67.
- Conti P, De Amici M, De Micheli C (2002) Selective agonists and antagonists for kainate receptors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2: 177-184.
- Cowley MA, Smith RG, Diano S et al (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649-661.
- Crespo CS, Cachero P, Jimenez LP et al (2014). Peptides and food intake. *Frontiers in Endocrinology* 5: 58-62.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 11: 327-335.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H et al (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141: 4255-4261.
- Date Y, Murakami N, Toshinai K et al (2002a) The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123: 1120-1128.

Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S et al (2002b) Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51: 124-129.

Date Y, Ueta Y, Yamashita H et al (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 748-753.

Davis SF, Derbenev AV, Williams KW et al (2004) Excitatory and inhibitory local circuit input to the rat dorsal motor nucleus of the vagus originating from the nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 1017: 208-217.

de La Serre CB, Kim YJ, Moran TH et al (2016) Dorsomedial hypothalamic NPY affects cholecystokinin-induced satiety via modulation of brain stem catecholamine neuronal signaling. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 311: 930-939.

Dun SL, Brailou GC, Tica AA (2010) Neuronostatin is co-expressed with somatostatin and mobilizes calcium in cultured rat hypothalamic neurons. *Neuroscience* 166: 455-463.

Elias CF, Lee CE, Kelly JF et al (2001) Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 432: 1-19.

Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E et al (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of Comparative Neurology* 402: 442-459.

Elmqvist JK, Maratos-Flier E, Saper CB et al (1998) Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature Neuroscience* 1: 445-450.

Elrich MM, Samson WK, Corbett JA (2016) Neuronostatin acts via GPR107 to increase c-AMP-independent PKA phosphorylation and proglucagon mRNA accumulation in pancreatic alpha-cells. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310: 143-155.

Engster KM, Krocze AL, Rose M (2016). Peripheral injection of bombesin induces c-Fos in NUCB2/nesfatin-1 neurons. *Brain Research* 1648: 46-53.

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P et al (2006) Leptin resistance and obesity. *Obesity* 14: 254-8.

Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnäs-Moberg K et al (1996) Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology* 63: 356-367.

Eyigor O, Centers A, Jennes L (2001) Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the rat hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology* 431: 101-124.

Eyigor O, Minbay FZ, Cavusoglu I, Jennes L (2005) Localization of kainate receptor subunit GluR5-immunoreactive cells in the rat hypothalamus. *Molecular Brain Research* 36: 38-44.

Eyigor O, Minbay Z, Cavusoglu I (2010) Activation of orexin neurons through non-NMDA glutamate receptors evidenced by c-Fos immunohistochemistry. *Endocrine* 37: 167-172.

Eyigor O, Minbay Z, Kafa MI (2012) Glutamate and orexin neurons. *Vitamins and Hormones* 89: 210-222.

Eyigor Ö, Minbay Z, Yurtseven Gök D (2015) Nesfatin ve Oreksin Etkileşimi: Besin Alımını Kontrol Eden Peptiderjik Sistemlerin Regülasyonunda Yer Alan Faktörlerin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması. Bursa 2015. Ankara: TÜBİTAK. Proje No: 113S377.

Feigenbaum JJ, Bergmann F, Richmond SA (1989) Nonpsychotropic cannabinoid acts as a functional N-methyl-D-aspartate receptor blocker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9584–9587.

Fix AS, Horn JW, Wightman KA et al. (1993) Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): A light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Experimental Neurology* . 123: 204-215

Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry* 42: 1-11.

Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic kainate receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 342-351.

Friedman JM (2010) A tale of two hormones. *Nature Medicine* 16: 1100-1106.

Fukushima A, Hagiwara H, Fujioka H et al (2015) Sex differences in feeding behavior in rats: the relationship with neuronal activation in the hypothalamus. *Frontiers in Neuroscience* 9: 88.

Funabashi T, Hagiwara H, Mogi K et al (2009) Sex differences in the responses of orexin neurons in the lateral hypothalamic area and feeding behavior to fasting. *Neuroscience Letters* 463: 31-34.

Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Frazao R (2016) Brain STAT5 signaling and behavioral control. *Molecular and Cellular Endocrinology* 30: 1-7.

Girardet C, Butler AA (2014) Neural melanocortin receptors in obesity and related metabolic disorders. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842: 482-494.

Giraudo SQ, Billington CJ, Levine AS (1998) Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Research* 809: 302-306.

Goldsmith PC, Thind KK, Perera AD et al (1994) Glutamate-immunoreactive neurons and their gonadotropin-releasing hormone-neuronal interactions in the monkey hypothalamus. *Endocrinology* 134: 858-868.

Goodman HM (2003) *Basic Medical Endocrinology*. 4th Edition, Academic Press, Amsterdam, pp: 66.

Gotoh K, Masaki T, Chiba S et al (2013) Brain-derived neurotrophic factor, corticotropin-releasing factor, and hypothalamic neuronal histamine interact to regulate feeding behavior. *Journal of Neurochemistry* 125: 588-598.

Grattan DR, Xu J, McLachlan MJ et al (2001) Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology*.142: 3935-3940.

Gunion MW, Kauffman GL, Tache Y (1990) Intrahypothalamic microinfusion of corticotropin-releasing factor elevates gastric bicarbonate secretion and protects against cold stress ulceration. *American Journal of Physiology* 258: 152-157.

Haemmerle CA, Campos AM, Bittencourt JC (2015) Melanin-concentrating hormone inputs to the nucleus accumbens originate from distinct hypothalamic sources and are apposed to GABAergic and cholinergic cells in the Long-Evans rat brain. *Neuroscience* 289: 392-405.

Herguedas B, Nafria JG, Cais O et al (2016) Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors. *Science* 352: 549-558.

Hermann GE, Van Meter MJ, Rood JC et al (2009) Proteinase activated receptors in the nucleus of the solitary tract: evidence for glial-neural interactions in autonomic control of the stomach. *Journal Neuroscience* 29: 9292-9300.

Hettes SR, Gonzaga J, Heyming TW et al (2003) Dual roles in feeding for AMPA/kainate receptors: receptor activation or inactivation within distinct hypothalamic regions elicits feeding behavior. *Brain Research* 992: 167-178.

Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 1047-1049.

Hisano S, Nogami H (2002) Transporters in the neurohypophysial neuroendocrine system, with special reference to vesicular glutamate transporters (BNPI and DNPI): a review. *Microscopy Research and Technique* 56: 122-131.

Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *Journal of Neuroendocrinology* 14: 259-268.

Horvath TL, Abizaid A, Dietrich MO et al (2012) Ghrelin-immunopositive hypothalamic neurons tie the circadian clock and visual system to the lateral hypothalamic arousal center. *Molecular Metabolism* 1: 79-85.

Hua Y, Ma H, Samson WK et al (2009) Neuronostatin inhibits cardiac contractile function via a protein kinase A- and JNK-dependent mechanism in murine hearts. *The American Journal of Physiology -Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297: 682-689.

Huang L, Li C (2000) Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Research* 10: 81-92.

Huszar D, Lynch CA, Dunmore JH et al (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141.

Isaac JT, Mellor J, Hurtado D et al (2004) Kainate receptor trafficking: physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics* 104: 163-172.

Iversen S, Iversen L, Saper CB (2004) *Principles of Neural Science*. 4th Edition, McGraw-Hill Press, New York, pp: 976-978.

Janssen P, Rotondo A, Mule F et al (2013) Review article: A comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 37: 18-36.

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T et al (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50: 2438-2443.

Kamiya H (2002) Kainate receptor-dependent presynaptic modulation and plasticity. *Neuroscience Research* 42: 1-6.

Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H (2002) Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 444: 39-62.

Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179: 4-29.

Kim MS, Rossi M, Abusnana S et al (2000) Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49: 177-182.

Kirchgessner AL, Sclafani A, Nilaver G (1988) Histochemical identification of a PVN-hindbrain feeding pathway. *Physiology & Behavior* 42: 529-543.

Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE et al (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 457: 213-235.

Kohno D, Nakata M, Maejima Y et al (2008) Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 149: 1295-1301.

Kohrs R; Durieux ME (1998) Ketamine: Teaching an old drug new tricks. *Anesthesia & Analgesia*. 87: 1186-1193.

Koles L, Wirkner K, Illes P (2001) Modulation of ionotropic glutamate receptor channels. *Neurochemical Research* 26: 925-932.

Kondyli M, Gatzounis G, Kyritsis A et al (2010) Immunohistochemical detection of phosphorylated JAK-2 and STAT-5 proteins and correlation with erythropoietin receptor (EpoR) expression status in human brain tumors. *Journal of Neuro-oncology* 100: 157-164.

Koyama Y, Takahashi K, Kodama T et al (2003) State dependent activity of neurons in the perifornical hypothalamic area during sleep and waking. *Neuroscience* 119: 1209-1219.

Kristensen P, Judge ME, Thim L et al (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.

Kubo M, Ito E (2004). Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. *Proteins* 56: 411-419.

Kumar J, Schuck P, Mayer LM (2011) Structure and assembly mechanism for heteromeric kainat receptors. *Neuron* 71: 319-331.

Kyrkouli SE, Stanley BG, Leibowitz SF (1987) Bombesin-induced anorexia: sites of action in the rat brain. *Peptides* 8: 237-241.

Ladyman SR, Fieldwick DM, Grattan DR (2012) Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction* 144: 83-90.

Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM et al (2002) Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143: 155-162.

Lee B, Koo J, Yun Jun J et al (2016) A mouse model for a partially inactive obesity-associated human MC3R variant. *Nature Communications* 7: 10522.

Lee JY, Muenzberg H, Gavrilova O et al (2008) Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *Plos One* 3: e1639.

- Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K (1981) Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiology & Behavior* 27: 1031-1040.
- Lerma J, Paternain AV, Rodriguez-Moreno A et al (2001) Molecular physiology of kainate receptors. *Physiological Reviews* 81: 971-998.
- Liu T, Kong D, Shah BP et al (2012) Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73: 511-522.
- Lomeli H, Wisden W, Kohler M et al (1992) High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain. *FEBS Letters* 307: 139-143.
- Low MJ (2004) The somatostatin neuroendocrine system: Physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 18: 607-622.
- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI et al (1993) AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53: 327-358.
- Mayer ML (2016) Structural biology of glutamate receptor ion channel complexes. *Current Opinion in Structural Biology* 41: 119-127.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 599-609.
- Meeker RB, McGinnis S, Greenwood RS et al (1994) Increased hypothalamic glutamate receptors induced by water deprivation. *Neuroendocrinology* 60: 477-485.
- Meldrum BS (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *Journal of Nutrition* 130: 1007-1015.
- Micheline LC, Marcelo MC, Amico J et al (2003). Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: Studies in oxytocin-deficient mice. *The American Journal of Physiology* 284: 2269-2276.
- Mietlicki EG, Novak EL, Daniels D (2009) The effect of ghrelin on water intake during dipsogenic conditions. *Physiology & Behavior* 96: 37-43.
- Minbay FZ, Eyigor O, Cavusoglu I (2006) Kainic acid activates oxytocinergic neurons through non-NMDA glutamate receptors. *International Journal of Neuroscience* 116: 587-600.
- Mo J, Yang A, Chen Z, et al (2013) Neuronostatin ameliorates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 58: 2903-2907.
- Mogi K, Funasabashi T, Mitsushima D et al (2005) Sex difference in the response of melanin-concentrating hormone neurons in the lateral hypothalamic area to glucose,

as revealed by the expression of phosphorylated cyclic adenosine 3, 5- monophosphate response element-binding protein. *Endocrinology* 146: 3325-3333.

Moran TH, Norgren R, Crosby R et al (1990) Central and peripheral vagal transport of cholecystinin binding sites occurs in afferent fibers. *Brain Research* 526: 95-102.

Mounien L, Bizet P, Boutelet I et al (2005) Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82: 164-170.

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ et al (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology* 8: 1298-308.

Mütze J, Roth J, Gestberger R et al (2007) Nuclear translocation of the transcription factor STAT5 in the rat brain after systemic leptin administration. *Neuroscience Letters* 417: 286-291.

Nambu T, Sakurai T, Mizukami K et al (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research* 827: 243-260.

Neumann ID (2007) Stimuli and consequences of dendritic release of oxytocin within the brain. *Biochemical Society Transactions* 35: 1252-1257.

Oh I, Shimizu H, Satoh T (2006) Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443: 709-712.

Olmann MM, Wilson BD, Yang YK (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.

Ozawa, S, Kamiya, H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 54: 581-618.

Pachernegg S, Strutz-Seebohm N, Hollmann M (2012) GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. *Trends in Neuroscience* 35: 240-249.

Pan W, Hsueh H, Kastin AJ (2007) Nesfatin-1 crosses the blood brain barrier without saturation. *Peptides* 28: 2223-2228.

Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience* 33: 1351-1365.

Papagapiou MP, Auer RN (1990) Regional neuroprotective effects of the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in hypoglycemic brain damage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 10: 270-276.

Paxinos G, Watson C (2009) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam.



Peters JH, McDougall SJ, Kellett DO et al (2008) Oxytocin enhances cranial visceral afferent synaptic transmission to the solitary tract nucleus. *Journal Neuroscience* 28: 11731-11740.

Petervari E, Szabad AO, Soos S et al (2011) Central alpha-MSH infusion in rats: Disparate anorexic vs. metabolic changes with aging. *Regulatory Peptides* 166: 105-111.

Petralia RS, Wenthold RJ (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 318: 329-354.

Petralia RS, Wenthold RJ (1996) Types of Excitatory Amino Acid Receptors and Their Localization in Nervous System and Hypothalamus. Editors: Brann DW, Mahesh VB, Excitatory Amino Acids: Their Role in Neuroendocrine Function. CRC Press, Boca Raton, pp: 55-101.

Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ (1994) Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *The Journal of Neuroscience* 14: 667-696.

Pinheiro P, Mülle C (2006) Kainate receptors. *Cell and Tissue Research* 326: 457-482.

Porte DJ, Baskin DG, Schwartz MW (2005) Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54: 1264-1276.

Reisine T, Bell GI (1995) Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrine Reviews* 16: 427-442.

Renquist BJ, Lippert RN, Sebag JA et al (2011) Physiological roles of the melanocortin MC (3) receptor. *European Journal of Pharmacology* 660: 13-20.

Ross MH, Pawlina W (2010) *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th Edition, Williams & Wilkins Press, Baltimore, pp: 744-751.

Sabatier N, Caquineau C, Douglas AJ et al (2003). Oxytocin released from magnocellular dendrites: Apotential modülator of alpha-melanocyte-stimulating hormone behavioral actions? *Annals of the New York Academy of Sciences* 994: 218-224.

Sabatier N, Caquineau C, Dayanithi G et al (2003) Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates oxytocin release from the dendrites of hypothalamic neurons while inhibiting oxytocin release from their terminals in the neurohypophysis. *Journal of Neuroscience* 23:10351-10358.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M et al (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585.

Salvatori AS, Elrich MM, Samson WK et al (2014) Neuronostatin inhibits glucose-stimulated insulin secretion via direct action on the pancreatic alpha-cell. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 306: 1257-1263.

Sam AH, Troke RC, Tan TM et al (2012) The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63: 46-56.

Samson WK, Zhang JV, Avsian-Kretchmer O et al (2008). Neuronostatin encoded by the somatostatin gene regulates neuronal, cardiovascular, and metabolic functions. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 3194-3195.

Santiago AM, Clegg DJ, Routh VH (2016) Ventromedial hypothalamic glucose sensing and glucose homeostasis vary throughout the estrous cycle. *Physiology & Behavior* 167: 248-254.

Sato I, Arima H, Ozaki N et al (2005) Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. *Journal of Neuroscience* 25: 8657-8664.

Sato K, Kiyama H, Tohyama M (1993) The differential expression patterns of Messenger RNAs encoding non-N-methyl-D- aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. *Neuroscience* 52: 515-539.

Segner H, Verburg-van Kemenade BM, Chadzinska M (2017). The immunomodulatory role of the hypothalamus-pituitary-gonad axis: Proximate mechanism for reproduction-immune trade offs? *Developmental & Comparative Immunology* 66: 43-60.

Severi I, Senzacqua M, Mondini E (2015) Activation of transcription factors STAT1 and STAT5 in the mouse median eminence after systemic ciliary neurotrophic factor administration. *Brain Research* 1622: 217-229.

Shimizu H, Oh I, Hashimoto K, Nakata M et al (2009) Peripheral administration of Nesfatin-1 reduces food intake in mice: The leptin independent mechanism. *Endocrinology* 150: 662-671.

Shirasaka T, Miyahara S, Kunitake T et al (2001) Orexin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281: 1114-1118.

Simerly RB (2015) Organization of The Hypothalamus. Editor: PAXINOS G, The Rat Nervous System. Fourth Edition, Elsevier Academic Press, USA, pp:267-294.

Simpson DA, Headley PM, Lumb BM (2008) Selective inhibition from the anterior hypothalamus of C- versus A-fibre mediated spinal nociception. *Pain* 136: 305-12.

Sohn JW (2015) Network of hypothalamic neurons that control appetite. *BMB Reports* 48: 229-233.

Sorensen LB1, Moller P, Flint A et al (2003) Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: A review of studies on humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 27: 1152-1166.

Squire L, Berg D, Bloom FE, et al (2008) *Fundamental Neuroscience*. 3rd Edition, Academic Press, San Diego, pp: 133-157.

Stanley BG, Chin AS, Leibowitz SF (1985) Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Research Bulletin* 14: 521-524.

Stanley BG, Ha LH, Spears LC et al (1993b) Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D,L-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or N-methyl-Daspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. *Brain Research* 613: 88-95.

Stanley BG, Willett VL, Donias HW et al (1993a) The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Research* 630: 41-49.

Stanley S, Wynne K, McGowan B (2005) Hormonal regulation of food intake. *Physiological Reviews* 85: 1131-1158.

Stengel A, Goebel M, Wang L (2010) Activation of brain somatostatin 2 receptors stimulates feeding in mice: analysis of food intake microstructure. *Physiology and Behavior* 101: 614-622.

Stengel A, Tache Y (2010) Nesfatin-1-Role as possible new potent regulator of food intake. *Regulatory Peptides* 163: 18-23.

Su SF, Yang AM, Yang SB (2012) Intracerebroventricular administration of neuronostatin delays gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Peptides* 35: 31-35.

Takamori S (2006) VGLUTs: 'Exciting' times for glutamatergic research? *Neuroscience Research* 55: 343-351.

Tang-Christensen M, Vrang N, Larsen PJ et al (2001) Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25: 42-47.

Tenk J, Rostas I, Füredi N et al (2016) Acute central effects of corticotropin-releasing factor (CRF) on energy balance: Effects of age and gender. *Peptides* 85: 63-72.

Toni R, Malaguti A, Benfenati F et al (2004) The human hypothalamus: a morpho-functional perspective. *Journal of Endocrinological Investigation* 27: 73-94.

Torekov SS, Madsbad S, Holst JJ et al (2011) Obesity—an indication for GLP-1 treatment? Obesity pathophysiology and GLP-1 treatment potential. *Obesity Reviews* 12: 593-601

Tracy AL, Clegg DJ, Johnson JD, et al (2008) The melanocortin antagonist AgRP (83-132) increases appetitive responding for a fat, but not a carbohydrate, reinforcer. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 89: 263-271.

Tse YC, Yung KK (2000) Cellular expression of ionotropic glutamate receptor subunits in subpopulations of neurons in the rat substantia nigra pars reticulata. *Brain Research* 854: 57-69.

Unger RH, Orci L (1978) Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Annual Review of Physiology* 40: 307-343.

Van Den Pol AN (1991) Glutamate and Aspartate Immunoreactivity in Hypothalamic Presynaptic Axons. *Journal of Neuroscience* 11: 2087-2101.

Van den Pol AN, Trombley PQ (1993) Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *Journal of Neuroscience* 13: 2829-2836.

Van Den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE (1990) Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250: 1276-1278.

Van Den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE (1996) Glutamate Neurotransmission in the Neuroendocrine Hypothalamus. Editors: Brann DW, Mahesh VB, *Excitatory Amino Acids: Their Role in Neuroendocrine Function*. CRC Press, Boca Raton, pp: 1-54.

Varela P, Escosteguy-Neto JC, Coelho CT (2014) Chronic light deprivation inhibits appetitive associative learning induced by ethanol and its respective c-Fos and pCREB expression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 17: 1815-1830.

Vicentic A, Jones DC (2007) The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320: 499-506.

Wakao H, Gouilleux F, Groner B (1994) Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *European Molecular Biology Organization* 13: 2182-2191.

Wang D, He X, Zhao Z et al (2015) Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Frontiers in Neuroanatomy* 9: 40.

Wang J, Osaka T, Inoue S (2003) Orexin-A-sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Brain Research* 971: 128-134.

Wang ZJ, Rao ZR, Shi JW (1992) Tyrosine hydroxylase-, neurotensin-, or cholecystinin-containing neurons in the nucleus tractus solitarii send projection fibers to the nucleus accumbens in the rat. *Brain Research* 578: 347-350.

Weigt HU, Fohr KJ, Georgieff M et al (2009) Xenon blocks AMPA and NMDA receptor channels by different mechanisms. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 69: 429-440.

Wisialowski T, Parker R, Preston E et al (2002) Adrenalectomy reduces neuropeptide Y-induced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation* 105: 1253-1259.

Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends in Neuroscience* 27: 321-328.

Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, et al (2000) Orexin-induced food intake involves Neuropeptide Y pathway. *Brain Research* 859: 404-409.

Yang AM, Ge WW, Lu SS (2011a) Central administration of neuronostatin induces antinociception in mice. *Peptides* 32: 1893-1901.

Yang AM, Ji YK, Su SF (2011b) Intracerebroventricular administration of neuronostatin induces depression-like effect in forced swim test of mice. *Peptides* 32: 1948-1952.

Yang SB, Yang AM, Shao TJ et al (2013) Synergistic analgesic effects between neuronostatin and morphine at the supraspinal level. *Peptides* 44: 105-110.

Yang XC, Reis DJ (1999) Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288: 544-549.

Yosten GL (2013) Novel neuropeptides in the control of food intake: Neuronostatin and nesfatin-1. *Vitamins and Hormones* 92: 1-25.

Yosten GL, Pate AT, Samson WK (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* 300: 1194-1199.

Yosten GL, Samson WK (2010) The melanocortins, not oxytocin, mediate the anorexigenic and antidipsogenic effects of neuronostatin. *Peptides* 31: 1711-1714.

Yosten GL, Samson WK (2011) Pressor doses of vasopressin result in only transient elevations in plasma peptide levels. *Peptides* 33: 342-345.

Yosten LC, Samson WK (2014) *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Interagtion*. Editors: De Luca JR, Menan JV, Johnson AK, Seperating Thirst from Hunger. 1st Edition, CRC Press, Boca Raton, pp: 103-110.

Yu JH, Kim MS (2012) Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes and Metabolism Journal* 36: 391-398.

Zarbin MA, Kuhar MJ, O'Donohue TL et al (1985) Autoradiographic localization of (125I-Tyr4) bombesin-binding sites in rat brain. *The Journal of Neuroscience* 5: 429-437.

Zhao JB, Zhang Y, Liu GZ et al (2011) Activation of JAK2/STAT pathway in cerebral cortex after experimental traumatic brain injury of rats. *Neuroscience Letters* 498: 147-152.

Zorilla EP, Inoue K, Fekete EM et al (2005) Measuring meals: structure of prandial food and water intake of rats. *Physiological Regulation of Appetite* 288: 1450-1467.

## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

**ABC:** Avidin biyotin kompleksi  
**ACTH:** Adrenokortikotropik hormon  
**AgRP:** Agouti-ilişkili protein  
**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoazolpropionik asit  
**AMPK:** Adenozin monofosfat protein kinaz  
**AR:** Antijen retrieval  
**ARC:** Arkuat nükleus  
**BDNF:** Beyin-türevli nörotrafik faktör  
**Ca<sup>2+</sup>:** Kalsiyum  
**cAMP:** Siklik adenozin monofosfat  
**CART:** Kokain ve amfetamin ilişkili transkript  
**CB1:** Endokannabinoid reseptör 1  
**CCK:** Kolesistokinin  
**CCK1:** Kolesistokinin reseptörü-1  
**CCK2:** Kolesistokinin reseptörü-2  
**CLIP:** Corticotropin-like Intermediate Peptide  
**CNQX:** 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione  
**CRF:** Kortikotropin salgılatıcı faktör  
**CRH:** Kortikotropin-salgılatıcı hormon  
**DAB:** Diaminobenzidin  
**dH<sub>2</sub>O:** Distile su  
**DMN:** Dorsomedial nükleus  
**DNQX** 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione  
**EDTA:** Etilendiamin tetra asetik asit disodyum  
**GABA:** Gama-amino butirik asit  
**GH:** Büyüme hormonu  
**GHRH:** Büyüme hormonu salgılatıcı hormon  
**GLP:** Glukagon-benzeri peptit  
**GLP-1:** Glukagon-benzeri peptit-1  
**GLP-2:** Glukagon-benzeri peptit-2  
**GM-CSF:** Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör  
**GluA:** AMPA reseptörleri  
**GluK:** Kainat reseptörleri  
**GluN:** NMDA reseptörleri  
**GnRH:** Gonodotropin-salgılatıcı hormon  
**GPR107:** G protein-bağlı reseptör 107  
**GRP:** Gastrin-salgılatıcı peptit  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** Hidrojen peroksit  
**HCl:** Hidroklorik asit  
**INSR:** İnsulin reseptörü  
**JNK:** c-Jun N-terminal kinazlar  
**K<sup>+</sup> :** Potasyum  
**Kainat:** 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin  
**LepR:** Leptin reseptörü  
**LHA/PFA:** Lateral hipotalamik alan/perifornikal alan  
**MC3R:** Melanokortin-3 reseptörü

**MC4R:** Melanokortin-4 reseptörü  
**MCH:** Melanin konsantre edici hormon  
**Mg<sup>2+</sup>:** Magnezyum  
**MK-801:** Dizocilpine  
**mRNA:** Mesajcı RNA  
**Na<sup>+</sup>:** Sodyum  
**NaCl:** Sodyum Klorür  
**NaOH:** Sodyum hidroksil  
**NMDA:** N-metil-D-aspartat  
**NPP:** N-Terminal Peptide of Proopiomelanocortin  
**NPY:** Nöropeptit Y  
**NST:** Nöronostatin  
**NTS:** Nükleus traktus solitarus  
**Ob:** Obesite  
**OXM:** Oksintomodülin  
**pCREB:** Fosforile c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein  
**PKA:** Protein kinaz-A  
**POMC:** Pro-opiomelanokortin  
**PP:** Pakretik polipeptit  
**pSTAT:** Fosforile sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri  
**PVN:** Paraventrikular nükleus  
**PYY:** Peptit YY  
**SCN:** Suprakiazmatik nükleus  
**SHU9119:** Melanokortin-3/4 reseptör antagonisti  
**SON:** Supraoptik nükleus  
**SST:** Somatostatin  
**SSTR:** Somatostatin reseptörü  
**TRH:** Tiroid salgılatıcı hormon  
**VGLUT:** Veziküler glutamat taşıyıcıları  
**VMN:** Ventromedial nükleus  
**Y1R:** NPY reseptörü  
 **$\alpha$ -MSH:** Alfa-melanosit stimüle edici hormon=melanokortin  
 **$\beta$ -LPH:**  $\beta$ -Lipotropin  
 **$\beta$ -MSH:**  $\beta$ -Melanotropin  
 **$\gamma$ -LPH:** Lipotropin Gamma  
 **$\gamma$ -MSH:**  $\gamma$ -Melanotropin



## 8. EKLER

### 8.1. Şekil Listesi

**Şekil 1.** Hipotalamusun organizasyonu (Iversen ve ark., 2004).

**Şekil 2.** Besin alımının düzenlenimi ile ilgili hipotalamik çekirdekler (<http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>. sitesindeki resimden modifiye edilmiştir. Erişim tarihi: 06.12.2016).

**Şekil 3.** Santral melanokortin sistem (<http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity2.php>. sitesindeki resimden modifiye edilmiştir. Erişim tarihi: 06.12.2016).

**Şekil 4.** Merkezi oksitosin sistemi.

**Şekil 5.** Besin alımının düzenlenmesinde rol oynayan hipotalamik çekirdekler, peptitler ve yolaklar (Simpson ve ark., 2008).

**Şekil 6.** İkili immünohistokimyasal işaretlemelerin değerlendirilmesi.

**Şekil 7.** Hipotalamusta nöronostatin nöronlarının dağılımı.

**Şekil 8.** Hipotalamusta nöronostatin-pozitif hücre uzantılarının dağılımı.

**Şekil 9.** Kainik asit uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 10.** Kainik asit uygulamasının erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 11.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte lokalize nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu.

**Şekil 12.** Kainik asit uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 13.** Kainik asit uygulamasının erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 14.** Kainik asit uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pCREB ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 15.** Dişi deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 16.** Erkek deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 17.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte lokalize nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu.

**Şekil 18.** Dişi deneklerde AMPA uygulamasının anterior periventriküler çekirdeğin nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 19.** Erkek deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 20.** Dişi deneklerde AMPA uygulamasının anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarındaki pCREB ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 21.** Dişi deneklerde NMDA uygulamasının anterior periventriküler çekirdeğin nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 22.** Erkek deneklerde NMDA uygulamasının anterior periventriküler çekirdeğin nöronostatin nöronlarındaki c-Fos ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 23.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte lokalize nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu.

**Şekil 24.** NMDA uygulamasının dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 25.** NMDA uygulamasının erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte yerleşik nöronostatin nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 26.** Açlık (A) ve beslenme (B) gruplarında supraoptik çekirdekte c-Fos proteini eksprese eden nesfatin nöronları.

**Şekil 27.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu.

**Şekil 28.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu.

**Şekil 29.** Anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte, beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında c-Fos ekspresyonu.

**Şekil 30.** Dişi deneklerde açlık sonrası beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında non-NMDA glutamat antagonisti olan CNQX'in etkisi.

**Şekil 31.** Erkek deneklerde açlık sonrası beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında non-NMDA glutamat antagonisti olan CNQX'in etkisi.

**Şekil 32.** Non-NMDA glutamat reseptör antagonisti CNQX'in açlık sonrası beslenme ile aktive olan nöronostatin nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi.

**Şekil 33.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK1/2/3-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 34.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK1/2/3-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 35.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK5-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 36.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluK5-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü

**Şekil 37.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA1-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü

**Şekil 38.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA1-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 39.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA4-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 40.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluA4-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 41.** Dişi deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluN1-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

**Şekil 42.** Erkek deneklerde anterior hipotalamik periventriküler çekirdekte GluN1-pozitif nöronostatin nöronlarının immünofloresan görüntüsü.

## 8.2. Tablo Listesi

**Tablo 1.** Besin alımı ve enerji homeostazı üzerine etkili peptitler

**Tablo 2.** Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikorlar.

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan primer antikorların dilüsyonları, inkübasyon süreleri, sıcaklıkları ve ön uygulamaları.

**Tablo 4.** Hayvan deneyi protokolü

**Tablo 5.** Hayvan deneyi protokolü

**Tablo 6.** Deneklerin ağırlık ve yem tüketim miktarları.

## 9. TEŞEKKÜR

Tezin planlanmasında, içeriğin düzenlenmesinde, tez sonuçlarımın yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında, tezin her aşamasında ve doktora eğitimim süresince desteklerini, özverilerini, bilgilerini ve zamanlarını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. F. Zehra Minbay'a ve Prof. Dr. Özhan Eyigör'e teşekkür ederim.

Tezim sırasında her türlü yardımlarından ve eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha Ersoy'a ve diğer tüm Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Şahin A. Sırmalı, Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu, Prof. Dr. Zeynep Kahveci ve Doç. Dr. Berrin Avcı'ya teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda yardımlarımı esirgemeyerek her zaman destek olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki çok sevdiğim asistan arkadaşlarım Duygu Gök Yurtseven, Esra Şen, Gülçin Ekizceli, Göktan Kuşpınar, K. Zülal Uygul, Ceren Oy ve Ayşe Akbaş'a teşekkür ederim.

Tezim sırasında her zaman desteğini gördüğüm, benimle beraber tezimde çalışan aynı zamanda dürüst ve karakter sahibi olan arkadaşım Cihan Çakır'a ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak beni yalnız bırakmayan ve desteğini esirgemeyen canım eşime ve aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

**Sema SERTER KOÇOĞLU**

## 10. ÖZGEÇMİŞ

20 Ekim 1984 yılında Denizli’de doğdu. Lise öğrenimini Denizli Anafartalar Lisesinde tamamladı. 2003 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında staj gördü. 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda ÖYP Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2011 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı.

### ÖDÜLLER

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği Bilimsel Araştırma İkincilik Ödülü (2010)

### KATILDIĞI KURSLAR

29-08-2011 / 18-11-2011: İngilizce (Denizli Aydın Lisan Kursu Dil Eğitimi)

29-08-2011 / 18-11-2011: İngilizce (Malta dil eğitimi)

30-05-2014/ 01-05-2014: Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu (THED-Ankara-2014)

02-06-2015/ 05-06-2015: İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırma Merkezi 3. Nöron Kültürü Kursu

### PROJELER

Mezankimal kök hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid sinyal yolunun rolü (Tübitak).

Üridin tedavisinin hiporoksik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda, nöron koruyucu etkisinin araştırılması (BAP).

Hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda üridin tedavisinin kognitif fonksiyonlara etkisi (BAP).

### YAYINLARI

B. Tezcan, S. Serter, E. Kiter, A.C. Tufan (2010). Dose dependent effect of C-type natriuretic peptide signaling in glycosaminoglycan synthesis during TGF- $\beta$ 1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Molecular Histology*, Vol. 41: 247-258.

Z. Minbay, S. Serter, DG Yurtseven, O. Eyigor (2017) Immunohistochemical localization of ionotropic glutamate receptors in the rat red nucleus. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* (Accepted).

## BİLDİRİLER

B. Tezcan, **S. Serter**, E. Kiter, A.C. Tufan (2010). Regulation of C type natriuretic peptide signaling during TGF- $\beta$ 1 induced chondrogenic differentiation of human trabecular bone-derived mesenchymal stem cells. 8th ISSCR (International Society for Stem Cell Research), 2010 Annual Meeting, Abstract Book, p. 180, Abstract WED/THU #K 15.

**S. Serter**, B. Tezcan, E. Kiter, A.C. Tufan (2010). Trabeküler kemik kökenli insan mezankimal kök hücrelerinin (MKH) izolasyonu, karakterizasyonları ve değişim potansiyellerinin gösterilmesi. X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2010 Uluslararası Katılımlı, Kongre Kitabı, 78 pp., İzmir, Türkiye, Mayıs 2010 (Sözlü sunu).

B. Tezcan, **S. Serter**, E. Kiter, A.C. Tufan (2010). Mezankimal kök hücrelerin TGF- $\beta$ 1 ile uyarılmış kondrojenik değişimi sürecinde, C-tipi natriüretik peptid sinyal yolunun rolü. . X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2010 Uluslararası Katılımlı, Kongre Kitabı, 1 pp., İzmir, Türkiye, Mayıs 2010.

M. Çetinkaya, T. Alkan, M. Cansev, Z. Minbay, **S. Serter**, E. Orenlili, N. Koksall (2012). The Neuroprotective effects of valproic acid, an histone deacetylase inhibitor in a neonatal hypoxic-ıscheic rat model. The 4th Congress of the European Academy of Pediatric Societies, Doi:10.1136/archdischild-2012-302724.1115, İstanbul, Türkiye (2012).

M. Özyurtlu, **S. Serter**, Serhat Özbek, Zehra Minbay. Kıkırdak şekillendirilmesinde 2-Oktil Siyanoakrilat kullanımı ve etkinliğinin dikiş materyalleri ile karşılaştırılması. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 2012 Uluslararası Katılımlı, Kongre Kitabı, 201 pp., Denizli, Türkiye, Mayıs 2012.

**S. Serter**, Z. Minbay, Ö. Eyigor. Expression of P-STAT5 in neuronostatin neurons induced by refeeding: an immunohistochemical study. 9th IBRO World Congress on Neuroscience, 2015 Annual Meeting, Abstract Book, p.781, Rio de Jenerio, Brazil, July 2015.

**S. Serter**, Z. Minbay, Ö. Eyigor. Açlık sonrası beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında Pstat5 ve c-Fos ekspresyonunun araştırılması. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi,2016 Uluslararası Katılımlı, Kongre kitabı, İzmir, Türkiye, Mayıs 2016.

**C. Çakır**, S. Serter, Z. Minbay, Ö. Eyigor. Nesfatin-1 nöronlarının açlık sonrası beslenmeye veya glukoz enjeksiyonuna bağlı aktivasyonu ve glutamaterjik sistemin rolü. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi,2016 Uluslararası Katılımlı, Kongre kitabı, İzmir, Türkiye, Mayıs 2016.