



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MERKEZİ VE PERİFERİK OLARAK VERİLEN CDP-KOLİNİN SERUM
NESFATİN-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Hikmet Aysin USTA

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2014



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MERKEZİ VE PERİFERİK OLARAK VERİLEN CDP-KOLİNİN SERUM
NESFATİN-1 DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Hikmet Aysin USTA

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Vahide SAVCI

BURSA-2014

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
Beslenmenin Kontrolü	3
CDP-Kolin	5
CDP-Kolinin Yapısı ve Sentezi	5
CDP-Kolinin Metabolizması	7
Dışarıdan Verilen CDP-Kolinin Dağılımı	9
CDP-Kolinin Etkileri	10
Nesfatin-1	11
Nesfatin-1'in Yapısı ve Sentezi	11
Nesfatin-1'in Dağılımı ve Etkileri	12
GEREÇ ve YÖNTEM	16
Cerrahi İşlemler	16
Arter ve Ven Kanülasyonu	16
İntraserebroventriküler Kanülasyon	17
Deney Planı	17
Kullanılan İlaç ve Kitler	19
İstatistiksel Değerlendirme	19
BULGULAR	20
Tok-Dişi Sıçanlarda İntravenöz Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi	20
Tok-Dişi Sıçanlarda İntraserebroventriküler Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi	20
Aç-Dişi Sıçanlarda İntraserebroventriküler Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi	22
Aç-Erkek Sıçanlarda İntraserebroventriküler Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi	23
TARTIŞMA ve SONUÇ	24
KAYNAKLAR	28
TEŞEKKÜR	34
ÖZGEÇMİŞ	35

ÖZET

Obezite, son yıllarda sıklığı giderek artan bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu nedenle iştah ve beslenme kontrolü ile ilgili çalışmalar önem kazanmıştır. CDP-kolinin, iştahla ilgili önemli peptidlerden leptin ve ghrelin düzeylerini etkilediği önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir. İlacın kronik kullanımda iştahı baskıladığı da bilinmektedir. Nesfatin-1'in de, yeni tanımlanan ve anoreksijenik özellikte endojen bir peptid olduğu bilindiği için, CDP-kolinin merkezi ve/veya periferik mekanizmaları uyararak dolaşımdaki nesfatin-1 düzeylerini etkileyebileceği öngörülmüştür.

Çalışmada, Wistar Albino türü tok-aç dişi ve erkek sıçanlar kullanıldı. CDP-kolin, intraserebroventriküler (0,25 µmol /5 µl, 0.50 µmol /5 µl ve 1 µmol /5 µl) veya intravenöz (50 mg/kg, 100 mg/kg ve 250 mg/kg) yolla verildi. Farklı zaman aralıklarında alınan kan örneklerindeki nesfatin-1 miktarları ölçüldü. Tok dişi sıçanlarda intravenöz yolla verilen CDP-kolin, nesfatin-1 düzeylerini istatistiksel açıdan anlamlı olarak etkilemediğinden, aç dişi sıçanlara intravenöz yoldan ilaç verilmedi. Cinsiyet farkının etkisini görmek amacıyla, aç erkek hayvanlara da intraserebroventriküler olarak etkin doz denendi.

Tok dişi hayvanlarda, intraserebroventriküler verilen CDP-kolin, serum nesfatin-1 düzeylerinde artış yönünde etki gösterirken, intravenöz yolla verildiğinde etkisinde istatistiksel açıdan anlamlılık saptanamamıştır. Aç dişi hayvanlara intraserebroventriküler yoldan verilen CDP-kolin ise, serum nesfatin-1 düzeylerini düşürmüştür. Aç erkek hayvanlarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızdan elde edilen bulgular, intraserebroventriküler yoldan verilen CDP-kolinin, nesfatin-1 düzeylerini etkilediğini, bu etkinin ne yönde olacağını açlık ve tokluk koşullarının belirlediğini ortaya koymuştur. İlaçla ilgili elde edilen sonuçların, obezite tedavisi ile ilgili yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

Anahtar Sözcükler: CDP-kolin, nesfatin-1, iştah

SUMMARY

EFFECTS OF PERIPHERALLY AND CENTRALLY ADMINISTERED CDP-CHOLINE ON NESFATIN-1 LEVELS IN SERUM

Obesity has become a health problem with increasing incidence every other year. Hence, studies on appetite and nutrition control have gained considerable importance. It has been observed in previous studies that CDP-choline affects levels of leptin and ghrelin, the appetite-related peptides. That CDP-choline suppresses the appetite when used chronically is also known. Since the recently defined nesfatin-1 has been shown to act as an endogenous anorexigenic peptide, it has been suggested that CDP-choline may affect nesfatin-1 levels by activating central and/or peripheral mechanisms.

Satiated (well-fed) or fasting female and male Wistar Albino rats were used in the present study. CDP-choline was administered by intracerebroventricular (0,25 $\mu\text{mol}/5 \mu\text{l}$, 0.50 $\mu\text{mol}/5 \mu\text{l}$ and 1 $\mu\text{mol}/5 \mu\text{l}$) and intravenous (50 mg/kg, 100 mg/kg and 250 mg/kg) route. Nesfatin-1 levels were analyzed in blood samples drawn in different time points. Since intravenous administration of CDP-choline did not affect nesfatin-1 levels in satiated female rats, it was not administered via intravenous route to fasting female rats. In order to examine the sex difference, fasting male rats received CDP-choline's effective dose via intracerebroventricular route.

CDP-choline administration to satiated female rats increased serum nesfatin-1 levels following intracerebroventricular, but not intravenous administration. On the other hand, intracerebroventricular administration of CDP-choline decreased serum nesfatin-1 levels in fasting female rats. Similar outcomes were observed in fasting male rats.

In conclusion, our study shows that intracerebroventricular administration of CDP-choline affects serum nesfatin-1 levels and the mode of its effect depends on hunger-satiety conditions. We believe that the outcomes of the present study about the medicine will shed light on future studies targeting obesity.

Key Words: CDP-choline, nesfatin-1, appetite

GİRİŞ

Sitidin-5'-difoskokolin (sitikolin veya CDP-kolin), vücudumuzda endojen olarak bulunan ve fosfatidilkolin sentezinde ara ürün olan, nükleotid yapılu bir moleküldür (1). Dışardan oral, intravenöz veya intraserebroventriküler yolla verildiğinde, hücre membranlarında yerleşik fosfodiesterazlar tarafından önce sitidinmonofosfat ve foskokoline hidroliz edilir (1). Bu iki molekül hızla defosforile olarak, ilacın final metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşür. Bu metabolitler hücrelere alınır, bir yandan hücre içi CDP-kolin sentezine katılırken, diğer yandan da kendilerine ait çeşitli fizyolojik ve farmakolojik etkilere aracılık ederler. Kolin hem membran fosfolipidlerinin yapısında bulunması, sentezine katılması ve hem de kolinerjik nörotransmitter asetilkolinin ön maddesi olması açısından önemli bir metabolittir (2, 3). Pirimidin nükleozidleri olan sitidin ve üridin de başlıca nükleik asitlerin yapımına katılırlar. Ayrıca sitidinin ardışık fosforilasyonu sonucu oluşan sitidin trifosfat, kolinin membran fosfatidilkolin sentezine katılımını artırır (3).

CDP-kolin gerek kendisi ve gerekse belirtilen metabolitleri aracılığı ile, özellikle de kolin aracılığı ile, çok çeşitli fizyolojik ve farmakolojik etkiler oluşturabilmektedir. Çok sayıda deneysel ve klinik modelde karakterize edilmiş ve halen incelenmekte olan bu etkiler, özellikle iskemi ve hipoksi koşullarındaki koruyucu rolüne odaklanmıştır (4-6). CDP-kolinin iskemi ve hipoksideki doku koruyucu etkileri büyük ölçüde onun membran bütünlüğü ve stabilizasyonu sağlamasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, bugün CDP-kolin çeşitli Avrupa ülkelerinde ve Japonya'da kafa travmaları ve felçte klinik kullanımı onaylanmış bir ilaçtır. Klinik kullanım dozlarında çok rahat tolere edilmektedir. Bugüne kadar herhangi ciddi bir yan etkisi ile ilgili rapor yayınlanmamıştır.

CDP-kolin, ayrıca, kardiyovasküler ve endokrin sisteme etkileri olan bir moleküldür. Laboratuvarımızda yapılmış çalışmalarda, merkezi veya periferik yolla verilen CDP-kolinin normal ve hipotansif hayvanlarda kan basıncında artış ve hipotansiyonda düzelme yarattığı (7, 8), mezenterik ve renal doku perfüzyonunu düzelttiği (9), yaşam oranlarını artırdığı (9) gösterilmiştir. CDP-kolin bu etkilerini temel olarak dolaşımdaki katekolaminler ve vazopressin düzeylerinde artış oluşturarak gerçekleştirmektedir (7, 8, 10). Merkezi yolla CDP-kolin verilmiş

hayvanlarda çeşitli hipofizer hormonların dolaşımdaki düzeylerinde artış olduğu da gösterilmiştir (10, 11). CDP-kolinin şok ve hipotansiyonu geri döndürücü etkisi, birçok endokrin etkisi ve analjezik etkisi, merkezi kolinerjik sistem aktivasyonu ve nikotinik ve/veya muskarinik reseptörlerin uyarılması sonucu gelişmektedir (7, 8, 10, 11, 31, 32, 57). Laboratuvarımızda yakın zamanda yapılmış olan bir çalışmada, intravenöz yolla verilen CDP-kolinin plazma vazopressin ve oksitosin düzeylerini artırdığı ve ayrıca, vazopressinerjik ve oksitosinerjik nöronlarda C-Fos aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir (12). CDP-kolin ayrıca, akut olarak verildiğinde plazma leptin düzeylerini artırmakta, ghrelin düzeylerini baskılamaktadır (13). Bununla uyumlu olarak, ilacın kronik kullanımında iştahı baskıladığı rapor edilmiştir (14).

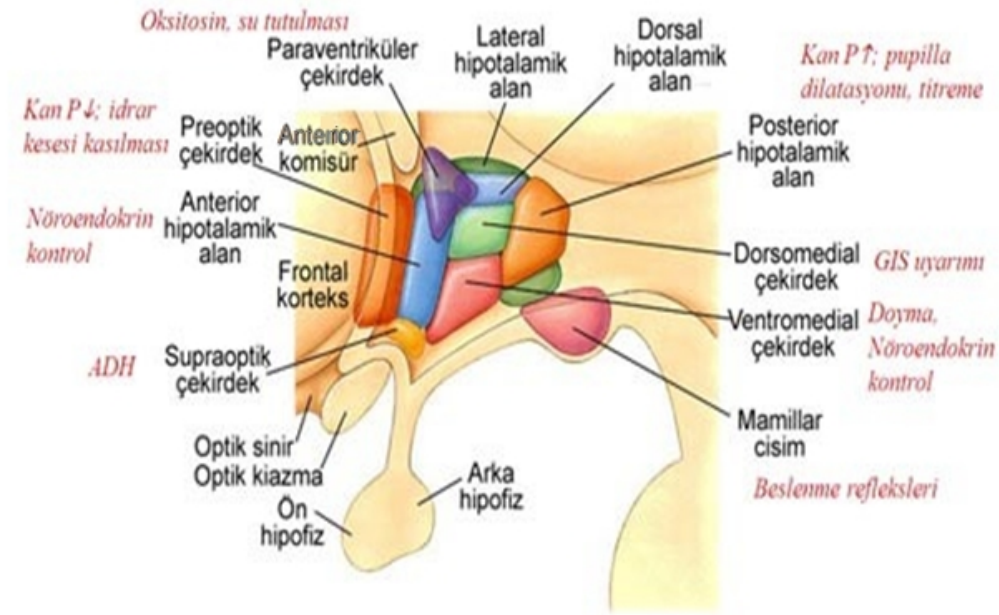
Nesfatin-1 molekülü, prekürsör proteini NUCB2 (nucleobindin 2)'den türeyen, yakın zamanda tanımlanmış bir anoreksijenik peptiddir (15). Ayrıca, sıçanlarda yapılan bir çalışmada, nesfatin-1'in, hipotalamusta paraventriküler ve supraoptik nükleuslardaki vazopressinerjik ve oksitosinerjik nöronlarda koekspresse edildiği gösterilmiştir (16).

CDP-kolin ile ilgili yukarıda verilen bilgiler ışığında, bu ilacın, merkezi ve/veya periferik mekanizmaları uyararak dolaşımdaki nesfatin-1 düzeylerini etkileyebileceği öngörülmüştür. Çalışmamız bu hipotezi test etmek üzere planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Beslenmenin Kontrolü

İştahın düzenlenmesinde, hem santral, hem de periferik sinyaller rol oynar. Santral sinyaller aracılığıyla regülasyonunda, hipotalamusta ana kontrol noktası arkuat nükleus (ARC)'dir. Paraventriküler nükleus, ventromedial nükleus, lateral hipotalamus ve perifornikal alanlar da iştahın kontrolünde önemli merkezlerdir. (Şekil-1). Ayrıca, kaudal beyin sisteminde bulunan nükleus traktus solitarius (NTS) da beslenmenin kontrolünde önemli rol oynayan bir diğer merkezdir (17).

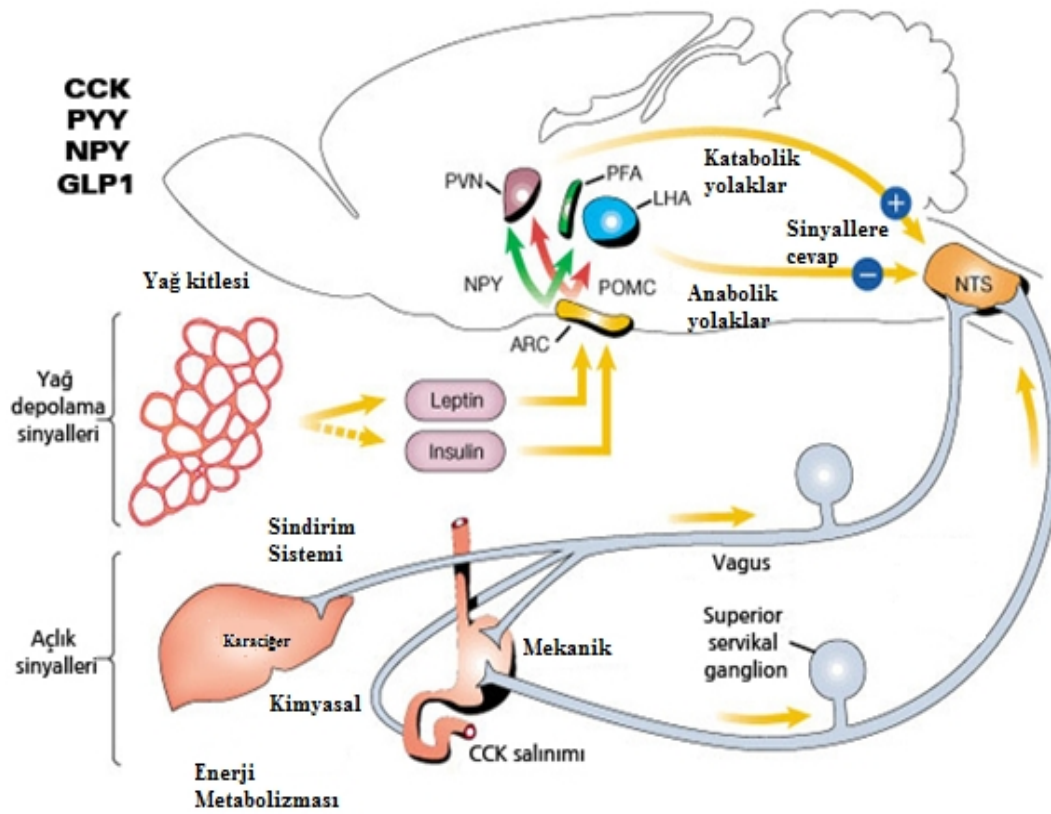


Şekil-1: Hipotalamik nükleuslar.

ADH: Antidiüretik hormon, GIS: Gastrointestinal sistem, P: Basınç

ARC'de besin alımını kontrol eden iki ayrı hücre topluluğu bulunmaktadır. Bunlardan Nöropeptid Y/Agouti gene-related peptid (NPY/AgRP) içeren nöron topluluğunun uyarılması besin alımını pozitif yönde etkilemektedir. Proopiomelanokortin (POMC) içeren nöronal topluluğun uyarılması ise, besin alımı üzerine negatif yönde etki etmektedir (17, 18).

Beslenmenin kontrolünde merkezi sinyaller kadar periferik sinyallerin de rol aldığı, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ghrelin, oreksin A ve midenin kontraksiyonu iştahı artırıcı yönde etkili olurken, leptin, insülin, kolesistokinin, pankreatik polipeptid Y (PPY) ve midenin distansiyonu, iştahın baskılanması yönünde etki göstermektedir (19) (Şekil-2).



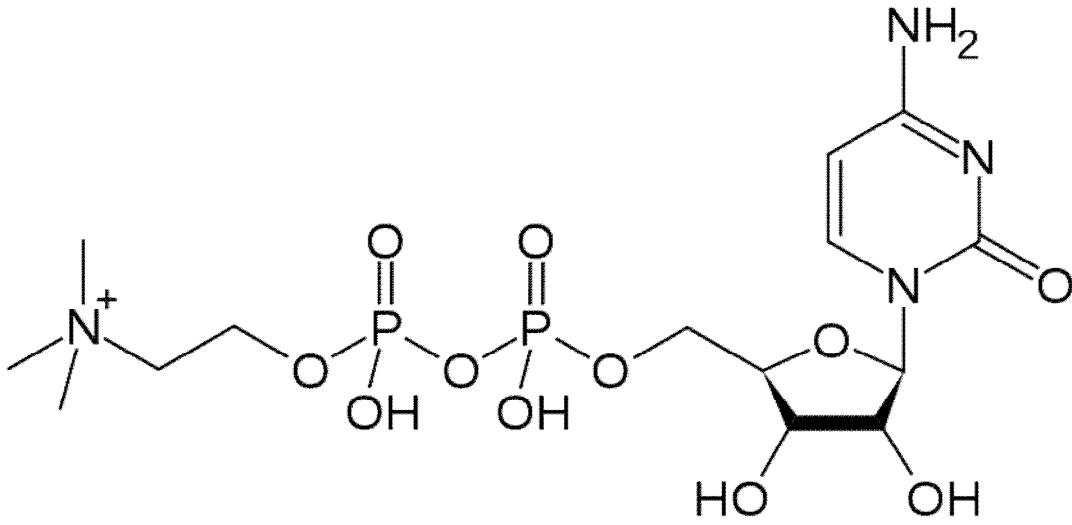
Şekil-2: Beslenmenin kontrolü

PVN: Paraventricüler nükleus, ARC: Arkuat nükleus, LHA: Lateral hipotalamik alan, PFA: Perifornikal alan, NTS: Nükleus traktus solitarius, POMC: Proopiomelanokortin, NPY: Nöropeptid Y, PPY: Peptid YY, CCK: Kolesistokinin, GLP-1: Glukagon benzeri peptid-1.

CDP-Kolin

CDP-Kolinin Yapısı ve Sentezi

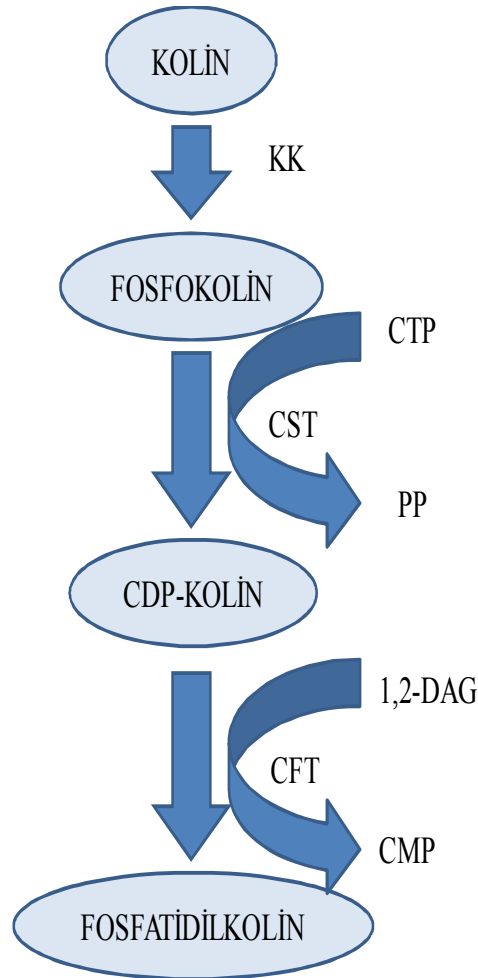
CDP-kolin, nükleotid yapısında vücutta endojen olarak üretilen ve hücre metabolizmasında önemli rol oynayan polar bir bileşiktir (Şekil-3). Monosodyum tuzu beyaz, kristalize, çok higroskopik olmasına rağmen, alkolde hemen hemen hiç çözünmeyen bir moleküldür (1). CDP-kolinin birçok ticari ismi bulunmakla birlikte, uluslararası alanda önerilen genel ismi 'Sitikolin'dir.



Şekil-3: CDP-kolinin molekül yapısı

CDP-kolin; membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolinin büyük bölümünün sentezinden sorumlu olan "Kennedy yolağında" bir ara ürün olarak sentezlenmektedir (1, 20). Kennedy yolağı, Kennedy ve Weiss tarafından 1956'da tanımlanmış, hücre membranında kolinden fosfatidilkolin yapımına uzanan üç basamaklı bir sentez yolağıdır (21). Bu yolağın hız kısıtlayıcı basamağında CDP-kolin bir ara ürün olarak sentezlenir. Kennedy yolağının birinci basamağında kolin, kolin kinaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla fosforile edilerek fosfokoline dönüşmekte, ikinci basamağında, fosfokolin ve sitidin-5'-trifosfat (CTP), CTP-fosfokolin sitidil transferaz (CCT) enzimi aracılığı ile reaksiyona girerek CDP-kolini oluşturmakta, üçüncü basamakta ise, CDP-kolinin fosfokolin grubu, sitidindifosfokolin-1,2-diaçilgliserol kolin fosfotransferaz enziminin katalizlediği bir

reaksiyonla, diaçilgliserole aktarılarak fosfatidilkolin sentezi gerçekleşmektedir (22, 23) (Şekil-4). Kolin ve sitidin gibi ön maddelerin ya da doğrudan CDP-kolinin verilmesiyle, endojen CDP-kolin miktarı artmakta, böylece fosfatidilkolin sentezinde artış sağlanabilmektedir (3, 24, 25).

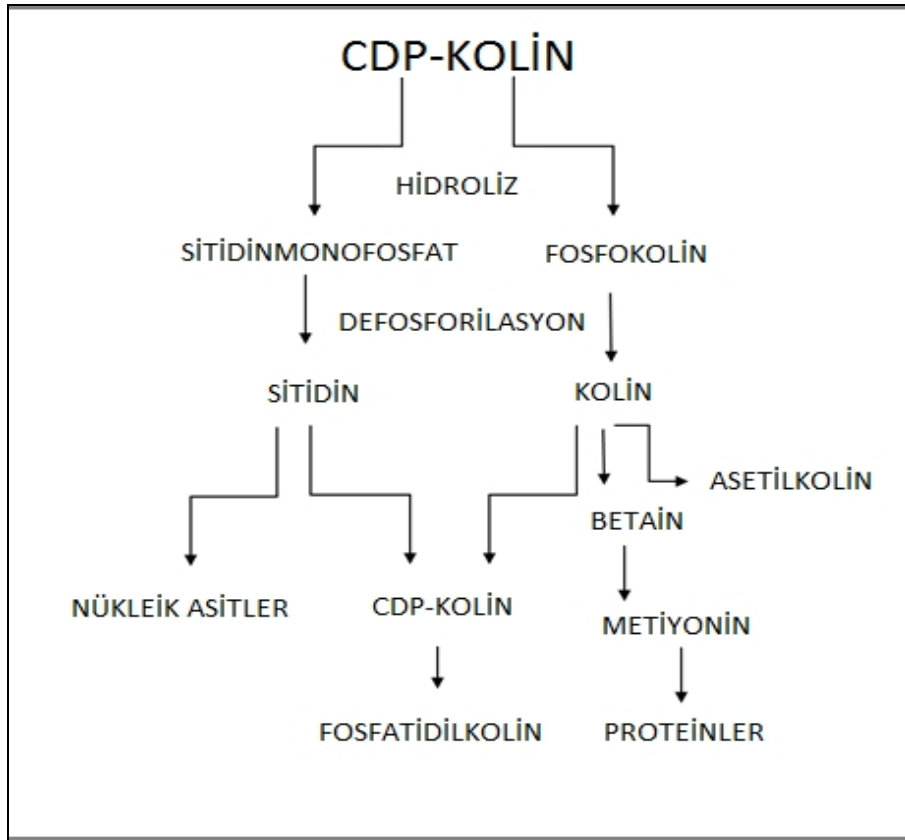


Şekil- 4: Kennedy yolağı aracılığı ile CDP-kolin sentezi.

KK: Kolin kinaz, CTP: Sitidintrifosfat, CMP: Sitidinmonofosfat, CST: CTP-fosfokolin sitidil transferaz, P: Fosfat grubu, DAG: Diaçilgliserol, CFT: Sitidin difosfokolin-1,2 diaçilgliserol kolin fosfotransferaz

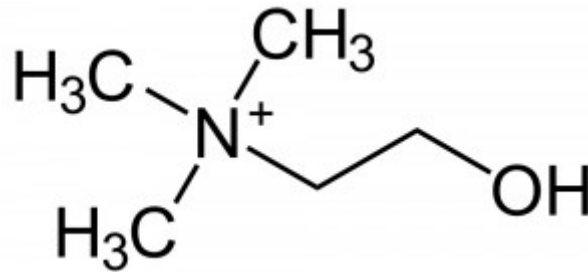
CDP-Kolinin Metabolizması

CDP-kolinin, hücre membranında bulunan fosfodiesterazlar ile hidrolizi sonucunda, hızla sitidinmonofosfat ve fosfokolin oluşur. Bu iki molekülün defosforilasyonu ile sitidin ve kolin açığa çıkar. Sitidin ve kolin hücre içine alınarak, CDP-kolinin yeniden sentezlenmesini sağladıkları gibi, aynı zamanda kendilerine ait etkilere de aracılık ederler (Şekil-5). Bir pirimidin nükleozidi olan sitidin, hücre içinde nükleik asitler ve proteinlerin yapısına katılmakla kalmaz; ayrıca, membran fosfatidilkolin yapısına kolin eklenmesini de artırır (26). Kolin ise, fosforilasyon yolağı ile fosfatidilkolin sentezinde kullanıldığı gibi, asetilasyon yolağı ile de nörotransmitter asetilkolin sentezinde kullanılır. Deney hayvanlarında CDP-kolin verilmesi sonrası dolaşımında kolin ve sitidin artarken (24), insanda, muhtemelen sitidin deaminaz enzim aktivitesindeki farklılık nedeniyle, sitidin hızla üridine dönüşür. Bu nedenle insanlarda CDP-kolin verilmesi sonrası dolaşımında sitidin yerine üridin artışları saptanmaktadır (27).



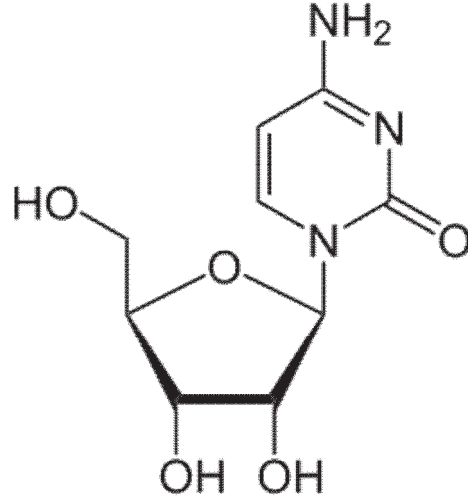
Şekil-5: CDP-kolin metabolizmasının şematik gösterimi

CDP-kolinin metabolitlerinden kolin, kolinerjik nörotransmitter olan asetilkolinin ön maddesidir. Tüm hücre membranlarında bulunan hidrofilik bir molekül olup, CDP-kolinin ana metabolitlerinden biridir. Kolin, beyin gelişimi ve fonksiyonu açısından önemli role sahiptir (28, 29). Kolin sentezi başlıca karaciğerde olup, buradan dolaşıma ve dokulara dağılır. Kolinin periferik dolaşımdan kan-beyin bariyerine geçişi, koline spesifik bir taşıyıcı sistem eşliğinde çok hızlı olmaktadır. Bu taşıyıcı sistem iki yönlü çalışmakta ve normal şartlarda kolin ile doyurulmamış durumda bulunmaktadır. Metabolik enerjiye ihtiyaç duymadan çalışan bu sistem bir konsantrasyon gradiyenti oluşturmaz. Bu nedenle, dolaşımdaki kolin konsantrasyonu dışarıdan kolin verilerek artırılmadıkça, net kolin akışının yönü beyinden kana doğrudur (30). Ancak dolaşımdaki yüksek konsantrasyonlardaki kolin, bu sistem ile beyindeki kolin düzeylerinde artışa neden olmakta ve asetilkolin sentezini, dolayısıyla kolinerjik iletiyi artırmaktadır. Kolinerjik iletideki artışa paralel olarak çeşitli farmakolojik etkiler ortaya çıkmaktadır (31). Ayrıca, son yıllarda kolinin $\alpha 7$ nAChR (nikotinik asetilkolin reseptörü) alt-tipine tam agonistik etki yaptığı bulunmuştur (32).



Şekil-6: Kolinin molekül yapısı

CDP-kolinin bir diğer metaboliti olan sitidin, bir primidin nükleozididir. Nükleozidler, nükleik asitlerin temel yapı taşlarıdır. Nükleozidlerin fosforile olmaları sonucu nükleotidler, nükleotidlerin kovalent bağlarla birleşmesiyle de nükleik asitler oluşur. CDP-kolinin yıkım ürünlerinden biri olduğu gibi, aynı zamanda sentezine katılan ön maddedir. Sitidinin, membran fosfatidilkolinine kolin eklenmesini artırarak membran fosfolipid sentezini artırdığı gösterilmiştir (3, 26).



Şekil-7: Sitidin'in molekül yapısı

Dışarıdan Verilen CDP-Kolinin Dağılımı

CDP-kolin, oral yolla uygulanmasından sonra, molekül yapısı nedeniyle absorbe edilmesi güç olduğundan, parçalanarak hızla aktif metabolitleri olan kolin ve sitidine dönüşmektedir.

Radyoizotop işaretli CDP-kolinin oral yolla verilmesinden otuz dakika sonra, midede büyük oranda CDP-kolin, barsakta ise daha çok kolin ve sitidin fraksiyonları olduğu gösterilmiştir (33). CDP-kolin, intestinal mukozada kısa sürede kolin ve sitidin metabolitlerine ayrılmaktadır (34). Yapılan başka bir çalışmada sıçanlara oral yoldan uygulanan ^{14}C ile işaretli CDP-kolinin biyoyararlanımının %92-95 olduğu gösterilmiştir (35).

CDP-kolinin, büyük ve polar bir bileşik olmasından dolayı kan-beyin bariyerinden geçişi zordur. Yapılan bir çalışmada, periferik yoldan verilen total dozun yaklaşık %0.25'inin beyin dokusuna geçebildiği gösterilmiştir (36, 37).

Dışarıdan verilen CDP-kolin, beyin dokusuna kolin ve sitidin olarak alınmakta, beyinde endojen CDP-kolin sentezinde ve ardından fosfolipid, nükleik asit ve proteinlerin sentezinde kullanılmaktadır (37). Yapılan başka bir çalışmada, farelerde ^{14}C işaretli CDP-kolin uygulamasından sonra, otoradyografik ve elektron mikroskopik yöntemlerle beyinleri incelendiğinde, radyoaktivitenin seçici olmaksızın hücre

membranlarında (38), kolinerjik nöronlarda ve purkinje hücrelerinin subsellüler membranlarında yoğun olarak toplandığı görülmüştür (39). Ayrıca, intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla verilen CDP-kolinin, hipotalamus ve lateral serebral ventrikülde kolin düzeyini arttırdığı laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (7).

CDP-Kolinin Etkileri

CDP-kolin dışarıdan verildiğinde (oral, intravenöz, intraperitoneal ve intraserebroventriküler yoldan) metabolize olur. Bu durum, dolaşımda ve beyinde kolin düzeylerinde artışa yol açar (24, 40-42). Kolin düzeylerindeki bu artış, asetilkolin (ACh) düzeylerinde artışa neden olur (7, 8). Buna bağlı olarak kolinerjik aktivitede artış meydana gelmektedir (7, 10, 11, 43). CDP-kolinin temel farmakolojik etkilerinde, kolin ve asetilkolin artışı aracılık eder.

CDP-kolinin membran koruyucu etkisinin, düzeyi artan kolinin, membran fosfolipidlerinden fosfatidilkolinin yapısına girmesi, ayrıca sitidinin hücre içinde CTP'ye dönüşüp, membran fosfatidilkolin yapısına kolin katılımını arttırması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (26). CDP-kolinin oral uygulanması sonucu, fosfolipaz A₂ enziminin aktivasyonu inhibe olmakta; fosfatidilkolin yıkımı azalmaktadır. Dolayısıyla CDP-kolinin oral yoldan verilmesi, membran yapısında koruyucu rol üstlenmektedir (44).

Kolinerjik sistem, kardiyovasküler düzenlemede önemli role sahiptir. Beyinde kolinerjik aktivite artışı, kan basıncında artışa yol açmaktadır (45-47). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda, CDP-kolinin kardiyovasküler sistem üzerine olan etkileri araştırılmış; merkezi veya periferik yoldan verilen CDP-kolinin normal ve hipotansif hayvanlarda zamana ve doza bağlı olarak kan basıncını arttırdığı gösterilmiştir (7, 8). Ayrıca, hemorajik şok oluşturulmuş anestezi altındaki hayvanlarda CDP-kolinin, superior mezenterik arter ve renal arter kan akımını arttırdığı ve sözkonusu hayvanlarda yaşam oranlarını yükselttiği ortaya konmuştur (9). Deneysel miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında, intravenöz yolla uygulanan CDP-kolinin kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (48).

Hipotalamohipofizer sistem, yoğun kolinerjik innervasyona sahiptir. İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda CDP-kolinin endokrin sistemi üzerinde etkili

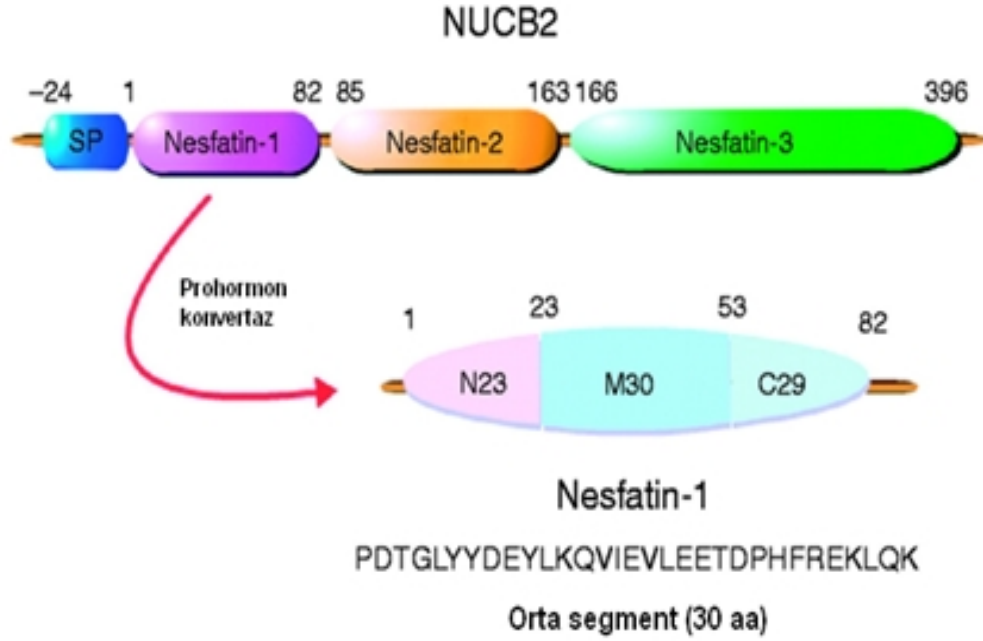
olduğu bulunmuştur. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda, sıçanlara intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolinin, adenokortikotropik hormonun (ACTH), büyüme hormonunun (GH), luteinize edici hormonun (LH) ve tiroid uyarıcı hormonun (TSH) dolaşımdaki düzeylerini artırdığı bulunmuştur (11). Ayrıca, intraserebroventriküler ve intravenöz olarak verilen CDP-kolin, plazma katekolamin ve vazopressin seviyelerinde yükselmeye neden olurken, intraperitoneal yolla verildiğinde de, serum insülin, plazma glukagon ve katekolamin düzeylerinde anlamlı artışlara neden olmuştur (7, 8, 10, 49).

CDP-kolinin ayrıca, serebral iskemi ve hipoksi (50, 51), kafa travmaları (52), nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve demans gibi hastalıklar), hafıza ve öğrenme bozukluklarında (24, 53-56) olumlu yönde etkileri mevcuttur. Bölümümüzde yapılan çalışmalarda CDP-kolinin analjezik aktivitesinin de olduğu gösterilmiştir (57, 58).

Nesfatin-1

Nesfatin-1'in Yapısı ve Sentezi

Nesfatin-1 ('NEFA/ Nucleobindin2-encoded satiety- and fat influencing protein'in kısaltması), ilk olarak 2006 yılında tanımlanmış, 82 aminoasitten oluşan anoreksijenik bir peptiddir. 396 aminoasitli bir protein olan NUCB2 (nukleobindin 2)'den prohormon konvertaz enzimi yardımı ile sentezlenir (15) (şekil-8). Serebrospinal sıvıda, ELISA yöntemi ile birbirine benzeyen  fragman tespit edilmiş ve bunlar nesfatin-1, nesfatin-2 ve nesfatin-3 olarak adlandırılmıştır (şekil-8).

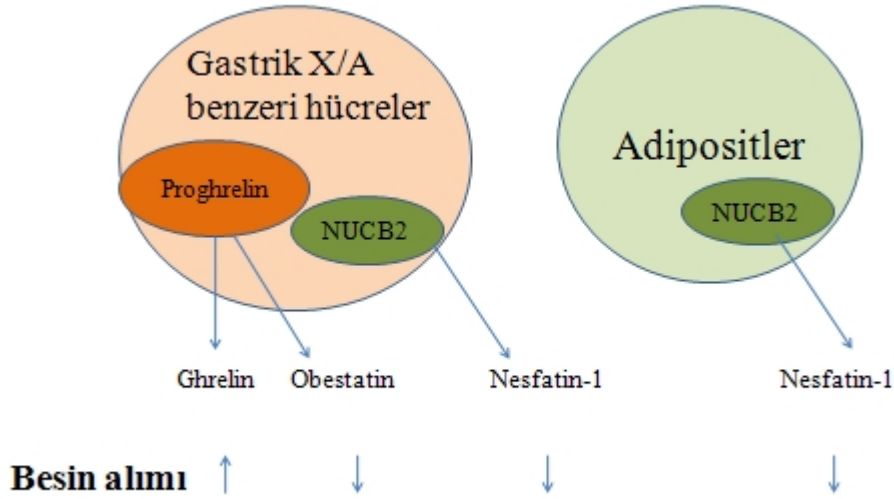


Şekil-8: NUCB2'nin yapısı ve nesfatin-1 oluşumu

SP: Sinyal peptidi, N23: Azot fragmanı (23 aminoasit), M30: Orta segment (30 aminoasit), C29: Karbon fragmanı (29 aminoasit), aa: aminoasit

Nesfatin-1'in Dağılımı ve Etkileri

Yapılan immüno boyama çalışmaları göstermiştir ki; sıçanlarda NUCB2/nesfatin-1 proteinleri, iştah ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynayan hipotalamusun paraventriküler (PVN), arkuat (ARC), supraoptik ve traktus solitarius çekirdeklerinde, lateral hipotalamik alan, dorsomediyal hipotalamik çekirdek, zona inserta, spinal kordun hücre gövdeleri (akson terminalinde bulunmamaktadır), vagusun dorsal çekirdeği ve hipofiz bezinde bulunur (15, 16, 59-64). Beyinde birçok bölgede sentez edildiği gösterilen nesfatin-1'in, adipoz doku, mide, pankreas adacıkları, kolon, karaciğer, testis gibi periferik dokularda da bulunduğu gösterilmiştir (63, 64) (Şekil-9).



Şekil-9: Periferik endokrin hücrelerden nesfatin-1 sekresyonu
NUCB2: Nükleobindin2

İştah ve metabolizmayı düzenleyici etkisinin birçok transmitter sisteminden bağımsız olduğu ancak melanokortin sistemi ile ilgili olduğu ortaya konmuştur (15, 65, 66).

Nesfatin-1'in melanin konsantre edici hormon (MCH) ile birlikte tuberal hipotalamik nöronlardan eksprese edildiği gösterilmiştir. Nesfatin-1'in MCH ile birlikte salınması sadece gıda alımının düzenlenmesinde değil, aynı zamanda MCH aracılığıyla beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde, otonom regülasyonunda, ruh hali ve bilinçli uykuda rol almaktadır. Ayrıca kardiyak fonksiyon, su alımı, mide boşalması, stres yanıtları ve anksiyete kontrolünde de büyük rol oynar (67). Beyinde aşırı nesfatin-1 iştah kaybı yaratır; doyumluk hissi verir. Aynı zamanda vücut yağ ve kilosunda düşüşe yol açar. Eksikliği ise tam ters etkilere sebep olur. Nesfatin-1'in anoreksijenik etki mekanizmasını aydınlatmak için yapılan bir çalışmada, leptin gen defekti bulunan Zucker sıçanlara intraserebroventriküler yoldan nesfatin-1 uygulanması besin alımında anlamlı oranda azalmaya neden olurken, bu hayvanlara nesfatin-1 antikorlarının verilmesi ise leptin enjeksiyonu ile birlikte azalması beklenen besin alımında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (15, 68). Leptin dirençli Zucker sıçanlarda ve erkek Wistar sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada nesfatin-1 intraserebroventriküler olarak uygulanmış ve doza bağımlı şekilde 6 saat boyunca gıda alımını inhibe etmiştir (69). Buna karşılık anoreksijenik bir hormon

olan melanokortin peptidinin enjeksiyonu ise PVN nöronlarındaki NUCB2'yi kodlayan genin miktarını anlamlı olarak artırmıştır (70). Bütün bu sonuçlar nesfatin-1'in anoreksijenik bir molekül olduğunu göstermektedir.

Nesfatin-1'in intraserebroventriküler ve intraperitoneal enjeksiyonla ya da intranazal kullanımda, doz-zaman bağımlı olarak, besin alımında ve vücut ağırlığında dikkat çekici bir azalma meydana gelmektedir. Proteinin, spesifik antikoru ile birlikte enjekte edilmesi, bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır. Nesfatin-2 ve Nesfatin-3 enjeksiyonları ise yiyecek alımını değiştirmemektedir. Nesfatin-1'in subkutan verilmesiyle daha uzun süreli gıda alımını baskıladığı da tespit edilmiştir (71). Bu tespitlere dayanılarak periferik nesfatin-1 uygulamasının obezite tedavisinde yeni bir seçenek olabileceği sonucuna varılmıştır. Başka bir çalışmada nesfatin-1'in intravenöz enjeksiyonunun hiperglisemik sıçanlarda kan glukoz seviyesini önemli ölçüde azalttığı, bu antihiperglisemik etkinin zaman, doz ve insülin bağımlı olduğu bulunmuştur (72). Nesfatin-1'in antihiperglisemik etki mekanizması halen tam olarak bilinmemekte, insülin sinyal yoluyla etkileşim gösterdiği tahmin edilmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmada, tip 2 diabetes hastalarında, plazma nesfatin-1 seviyelerinin beden-kitle indeksi, plazma insülini ve insülin direnci ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir (73, 74). Ayrıca nesfatin-1'in sıçan gastrik mukozasındaki immün reaktivitesi tespit edilmiş ve pek çok nesfatin-1 reaktif hücrenin diabetes patofizyolojisinde rolü olan ghrelini de eksprese ettiği bulunmuştur (63).

Nesfatin-1'in aynı zamanda sature olmadan kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir. Sonuçta, periferik olarak nesfatin-1 uygulanması, ekzojen nesfatin-1'in beyine ulaşmasını sağlar ve bu da beslenme davranışını inhibe eder (75). Burada önemli olan nokta kan beyin bariyerinden çift yönlü olarak geçebilen nesfatin-1'in, kan beyin bariyerinden geçişinde basit difüzyonun yeterli olması nedeniyle taşıyıcı sistemlerin doyumluğuna ihtiyaç duyulmaması ve ileride geliştirilecek olan farmakolojik tedavilerde sistemik toksisiteye neden olacak dozajlara çıkılmasına gerek olmamasıdır.

Nesfatin-1'in güçlü anoreksijenik etkisinin yanında, mRNA'sı hipotalamusun paraventricüler çekirdeğinde eksprese olduğundan kardiyovasküler fonksiyonun kontrolünde de önemli rol alır. Yapılan bir çalışmada, intraserebroventriküler nesfatin-1 uygulanan sıçanlarda, uygulamayı takiben ortalama arter basıncında önemli artışlar gözlenmiştir. Tedavi öncesi melanokortin-3/4 reseptör antagonisti (SHU9119- i.s.v.) veya α -adrenerjik antagonist (fentolamin-intraarteriyel) uygulanması nesfatin-1

ile indüklenen ortalama arter basıncındaki artışı ortadan kaldırır. Bu durum, nesfatin-1'in merkezi melanokortin sistemi ile etkileşime girerek sempatik sinir sistemi aktivasyonunu arttırdığını ve böylelikle ortalama arter basıncında artışa neden olduğunu düşündürmüştür (76). Bu bulgular, nesfatin-1'in merkezi kardiyovasküler dengenin sağlanmasında da aracılığı olduğunu göstermekle birlikte, peptidin kalp performansını doğrudan kontrol edip edemediğini henüz göstermemektedir. Aynı zamanda hipertansif olduğu yönündeki çalışmaları destekler şekilde nesfatin-1'in, periferik arterlerin NO- bağımlı damar genişlemesine karşı koyduğu bulunmuştur (77).

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 250-300 g ağırlığında, 3 aylık Wistar albino türü erişkin dişi ve erkek sıçanlar kullanıldı. Bu hayvanlar, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmaya başlanmadan önce, Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındı (Tarih: 14.02.2012; Karar No: 2012-02/02; Tarih: 06.05.2014; Karar No: 2014-08/04).

Çalışma öncesi hayvanlar Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda bulunan dinlendirme ve hayvan bakım odasında, 5'li gruplar halinde, su ve yem alımları serbest bırakılarak bakıldılar. Sıçanların bulunduğu ortamın ısı 20-24 °C olacak şekilde sabit tutulmakta ve oda 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık (07.00-19.00 arası aydınlık) olacak şekilde aydınlatılmaktadır.

Cerrahi İşlemler

Sıçanlara sevofluran anestezisi (% 3 konsantrasyon % 100 oksijen içinde) verildi. Anestezi sonrası tüm gruplardaki hayvanlarda ortak olarak arteria karotis kateterizasyonu yapıldı. Ayrıca, bir gruba vena jugularis, bir gruba da intraserebroventriküler (i.s.v.) kateterizasyon uygulandı. Arter kanülü kan örneklerinin toplanması için yerleştirildi. Ven kateterizasyonu, periferik ilaç enjeksiyonları için; intraserebroventriküler kateter, merkezi ilaç enjeksiyonları için kullanıldı. Kateterizasyon için, 125 U/ml heparin içeren tuzlu su ile doldurulmuş polietilen kateterlerden (PE 50) yararlanıldı. Cerrahi işlemler bitiminde hayvanlar, anesteziden çıkmalarını beklemek üzere bireysel kafeslerine yerleştirildi.

Arter ve Ven Kanülasyonları

Arter ve ven kanülasyonları için, anestezisi altındaki sıçanlara, ısıtılmış ped üzerinde sırtüstü yatırılmış ve takiben boyun orta hattında vertikal düzlemde yaklaşık 2 cm'lik bir kesi yapıldı. Cilt ve cilt altı dokuların ayrılması ile trakea üzerindeki kasın sol yan kısmından ven (daha yüzeysel yerleşimli) ve arter (daha derinde) lokalizasyonu görünür hale getirildi. Burada işlemlerin sırası önce ven ardından

arterin kanülasyonu şeklinde düzenlendi. Görünür hale getirilen ve çevre dokulardan ayrılan, izole edilen damarlar ipe askıya alındı ve üzerine yapılan yüzeysel bir kesi sonrası 125 U/ml heparinli tuzlu su ile doldurulmuş polietilen (PE 50) kateter yerleştirildi. Arter kateterizasyonu sırasında nervus vagus ve servikal sempatik sinirin zarar görmemesine dikkat edildi. Damarlara sabitlenmesinin ardından kateterler cilt altı dokusunu takip ederek sıçan ensesinden çıkarıldı. Bu şekilde, anestezinin etkisinden çıktıktan sonra uyanık olan hayvanlarda yapılacak deneysel işlemlerin daha sağlıklı olması sağlandı.

İntraserebroventriküler Kanülasyon

İntraserebroventriküler (i.s.v.) kanülasyon için, bregma giriş koordinatları George Paxinos ve Charles Watson'un 'The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates' adlı sıçan beyin atlasından yararlanılarak belirlendi (Bregmaya göre A-1,0 mm; L-1,5 mm; V-4,5 mm) (78).

Cerrahi işleme başlamadan önce sıçanların iki kulağı arasında kalan işlem yapılacak bölge tıraş edildi; ardından insizyon yapıldı. Cilt ve cilt altı dokular geçilerek kafatasına ulaşıldı; buradaki fasyalar uzaklaştırılıp kanamanın kontrol altına alınması beklendi. Bregma açık bir şekilde görünür hale geldikten sonra, kafatası steril bir bezle temizlenerek, orta hattın 1,5 mm sağ yanında ve bregmanın 1-1,5 mm arkasındaki giriş koordinatı işaretlenerek bir delik açıldı. Bu delikten sağ lateral ventriküle, dik olarak ve alt ucu kafatası yüzeyinden 4,2-4,5 mm kadar derinliğe inecek şekilde 10 mm uzunluğunda bir kanül (20 numara hipodermik paslanmaz çelik iğneden kesilerek hazırlanmış) yerleştirilip üstte kalan kısmı dental akrilik ile kafatasına tutturuldu.

Deney Planı

Deneyler uyanık hayvanlarda yapılacağı için, cerrahi işlemlerin tamamlanmasından sonra sıçanlar, en az 4 saat anestezinin etkisinin geçmesi için tek başlarına tutuldukları özel kafeslerinde bekletildiler.

Deneyin başlangıcında, sıçanların arteriyel kateterlerinden 0.3 ml kan alınarak kontrol nesfatin-1 düzeylerinin ölçümünde kullanıldı. CDP-kolin; intravenöz yoldan, 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 250 mg/kg dozlarında, tuzlu su ise 1 ml/kg dozunda verildi.

CDP-kolinin intraserebroventriküler yoldan verilecek dozları ise; 0,25 µmol /5 µl, 0.50 µmol /5 µl ve 1 µmol /5 µl olarak belirlenirken, tuzlu su 5 µl olacak şekilde ayarlandı. Enjeksiyonlardan sonra; 2, 5, 10, 20, 40, 60 ve 90. dakikalarda 0.3 ml kan örnekleri alındı ve alınan kan miktarı eş hacimli tuzlu su solüsyonu ile replase edildi. Diğer taraftan çalışmamız sürerken, gerek hayvanların nesfatin-1 düzeylerinin literatürde belirtilen bazal düzeylerden (0,5-4 ng/ml) daha yüksek bulunması ve gerekse gruplar arasında varyasyonların fazla olması nedeniyle deneylerin açıklık koşullarında tekrarlanmasına karar verildi (74, 85). Bu grupta çalışılacak deney hayvanları bir gece önceden yem alımları sonlandırılarak 24 saat aç bırakılmış şekilde deneye alındılar. Ayrıca çalışmada, deneylerin erkek ve dişi sıçanlarda karşılaştırmalı yapılması uygun bulundu. Bu gruplarda aç bırakılmış erkek ve dişi sıçanlara 1 µmol /5 µl dozda CDP-kolin intraserebroventriküler yolla enjekte edildi.

Kan örnekleri, EDTA içeren eppendorf tüplere toplandı. Örnekler, +4 °C'de santrifüj edildi; nesfatin-1 analizi için serumları ayrılarak -70 °C'de saklandı.

Bregma giriş koordinatları ve intraserebroventriküler kanüllerin yerlerinin doğrulanması için, rastgele seçilmiş sıçanlara 1:10 oranında sulandırılmış metilen mavisi i.s.v. yolla uygulandı ve takiben sıçanlar sakrifiye edilerek beyin kesitleri makroskopik olarak incelendi (Şekil-10). Deneyin bitmesini takiben deneylerde yer alan diğer sıçanlar da, uygun şekilde yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi.

Ticari olarak sağlanan nesfatin-1 kiti (ELISA) kullanılarak serumdaki nesfatin-1 düzeyleri ölçüldü. Bunun için, kit prospektüsüne uygun olarak çalışıldı ve oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de okundu.



Şekil-10: Metilen mavisinin intraserebroventriküler enjeksiyonu ile bregma giriş koordinatlarının ve intraserebroventriküler kanülün lokalizasyonunun doğrulanması

Kullanılan İlaç ve Kitler

Çalışmada kullanılan CDP-kolin Sigma (Sigma Chem. Co., MO, USA) firmasından temin edildi ve tuzlu su (%0,9 NaCl) içinde hazırlandı. Nesfatin-1 düzeylerinin ölçümü için, Phoenix Pharmaceuticals, Inc. Firması tarafından üretilmiş olan ELISA kitler kullanıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada istatistiksel analizler için SigmaPlot® (versiyon 12.0) programı kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü ANOVA ve çift yönlü ANOVA kullanılarak yapıldı. Post-hoc analizi için Holm-Sidak testi kullanıldı. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değerinin 0.05'ten küçük olduğu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (*p<0.05).

BULGULAR

Tok – Dişi Sıçanlarda İntravenöz Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi

Yem alımları serbest bırakılmış (tok) sıçanlarda bazal nesfatin-1 düzeyleri 11.5 ± 1.4 ng/ml (n=23) olarak ölçüldü. İntravenöz yolla verilen CDP-kolin (50, 100 ve 250 mg/kg) serum nesfatin-1 düzeylerinde, incelenen 60 dakika boyunca, anlamlı bir değişiklik yaratmadı (Tablo-1).

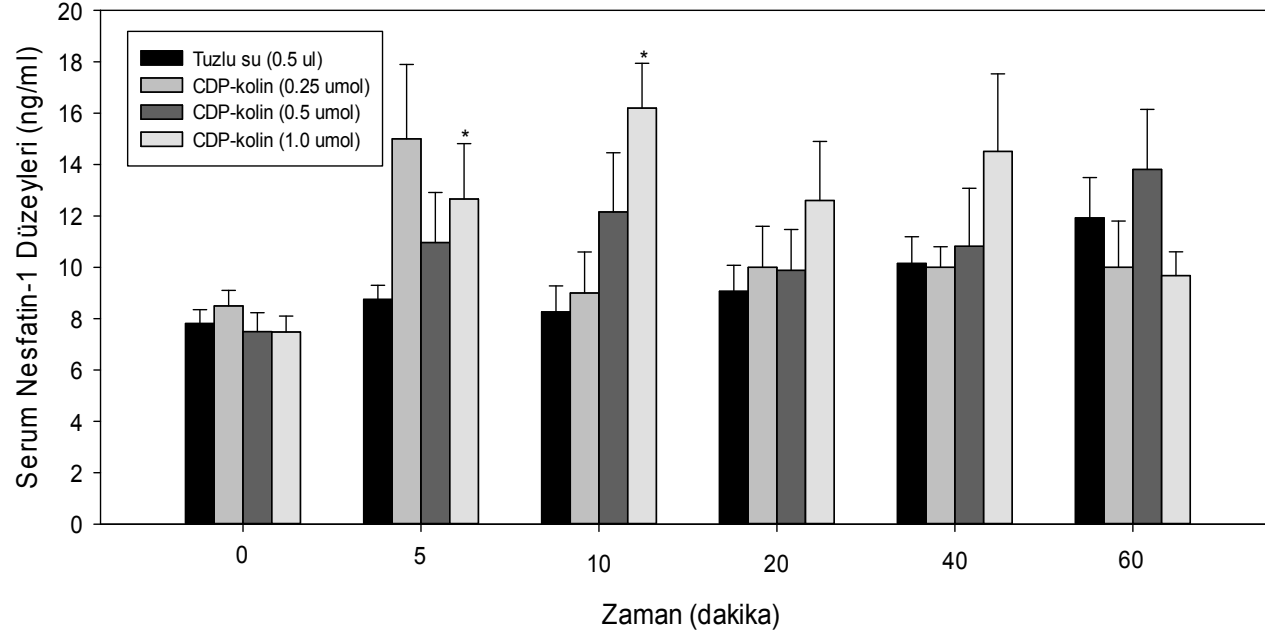
Tablo-1: İntravenöz yolla verilen CDP-kolinin tok-dişi sıçanlarda serum nesfatin-1 düzeylerine etkisi.

Su ve yem alımları serbest bırakılan dişi sıçanlardan arter kantülü aracılığıyla 0.3 ml kan bazal nesfatin-1 seviye ölçümleri için alındı. Tuzlu su veya CDP-kolin (50, 100 veya 250 mg/kg; i.v.) enjeksiyonunu takiben 2., 5., 10., 20., 40., ve 60. dakikalarda kan örnekleri alındı ve serumları ayrılarak nesfatin-1 düzeyleri ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve her bir grup 5-7 deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır.

Tedavi	Zaman (Dakika)						
	0	2	5	10	20	40	60
Tuzlu su (1 ml/kg)	10 ± 2	11 ± 2	7 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	10 ± 1
CDP-kolin (50 mg/kg)	15 ± 3	10 ± 1	34 ± 13	14 ± 4	19 ± 5	11 ± 2	13 ± 3
CDP-kolin (100 mg/kg)	11 ± 3	9 ± 1	9 ± 2	9 ± 1	9 ± 1	10 ± 1	11 ± 1
CDP-kolin (250 mg/kg)	10 ± 2	13 ± 3	14 ± 3	11 ± 3	12 ± 2	12 ± 3	13 ± 3

Tok – Dişi Sıçanlarda İntraserebroventriküler Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi

Bu grupta yem alımları serbest bırakılan dişi sıçanlara CDP-kolin intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla verilmiştir. Tuzlu su (5 ul) enjeksiyonu bazal nesfatin-1 düzeylerini etkilemezken CDP-kolin (0.25, 0.5 ve 1.0 μ mol) enjeksiyonu doza ve zamana bağlı serum nesfatin-1 düzeylerini değiştirmiştir (Şekil 11). Her bir dozda nesfatin-1 düzeylerinde artış yönünde etki gözlenmiş; ancak yapılan istatistiki değerlendirmede sadece 1.0 μ mol CDP-kolin sonrası 5. ve 10. dakikalardaki artışlar anlamlı bulunmuştur (Şekil-11).

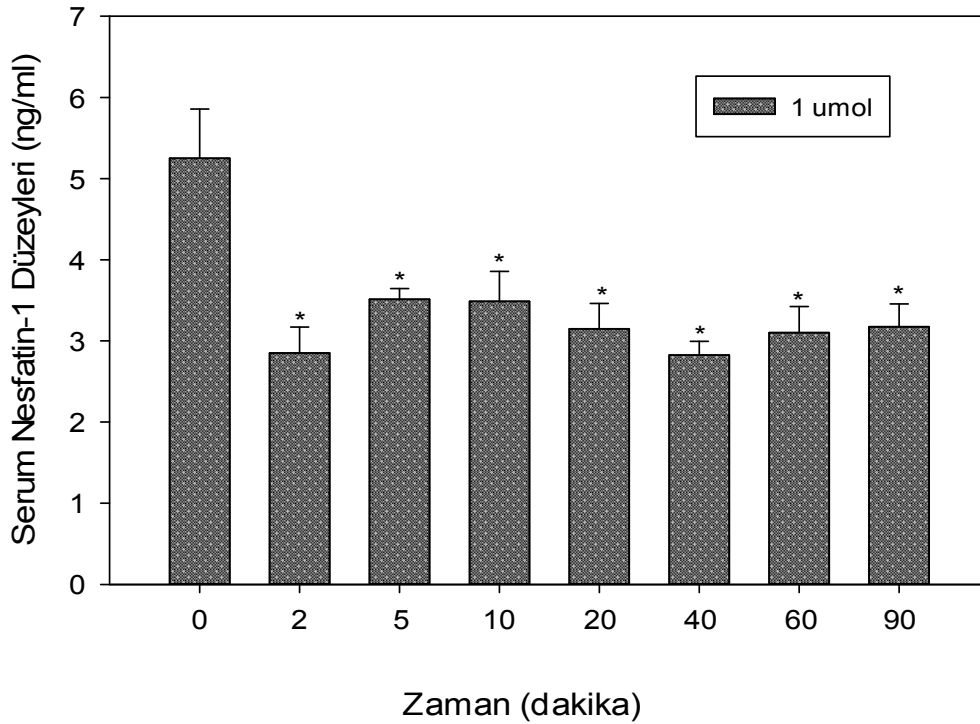


Şekil-11: Tok dişi sıçanlarda intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolinin serum nesfatin-1 düzeylerine etkisi.

Su ve yem alımları serbest bırakılan dişi sıçanlardan arter kanülü aracılığıyla 0.3 ml kan bazal nesfatin-1 seviye ölçümleri için alındı. Tuzlu su (5ul; i.s.v.) veya CDP-kolin (0.25, 0.5 ve 1.0 μ mol; i.s.v.) enjeksiyonunu takiben 5., 10., 20., 40., ve 60. dakikalarda kan örnekleri alındı ve serumları ayrılarak nesfatin-1 düzeyleri ölçüldü. Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir ve her bir grup 8-12 deney hayvanı sonuçlarının ortalamasıdır. İstatistiksel değerlendirme İki Yönlü ANOVA kullanılarak yapılmıştır. * $p < 0.05$, kontrol grubundan anlamlı olarak farklıdır.

Aç – Dişi Sıçanlarda İntraserebroventriküler Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi

Önceki incelemelerimizde CDP-kolinin intravenöz enjeksiyonu sonrası anlamlı bir etki bulunmaması ve intraserebroventriküler yolla verilen ilacın nesfatin-1 düzeylerini etkilemesi gözönünde bulundurularak, çalışmanın bundan sonraki kısmında sadece intraserebroventriküler enjeksiyonlarla devam edilmiştir. Nesfatin-1'in iştah üzerine etkili bir molekül olması ve tokluk halinde alınan kan örneklerinde bazal düzeylerin dalgalanmalar göstermesi, CDP-kolinin molekül üzerine olan etkilerinin açlık koşullarında da incelenmesini gerekli kılmıştır. Bunun üzerine yem alımları 24 saat önce sonlandırılmış dişi sıçanlara etkili doz olan 1 µmol CDP-kolin i.s.v. yolla enjekte edilmiş ve serum nesfatin-1 düzeyleri ölçülmüştür. İlginç olarak CDP-kolin 2. dakikadan itibaren serum nesfatin-1 düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur (Şekil-12).

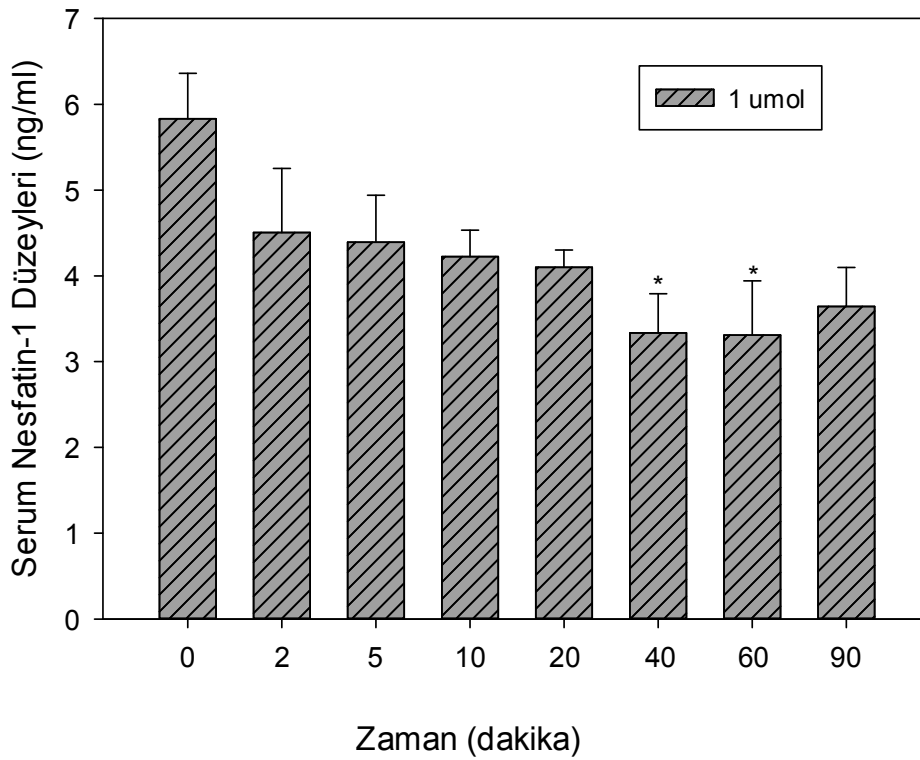


Şekil-12: Aç bırakılmış dişi sıçanlarda intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolinin serum nesfatin-1 düzeylerine etkisi.

Deneyden 24 saat önce yemleri alınarak aç bırakılan ve sadece su alımına izin verilen dişi sıçanlara, bazal ölçüm için kan örneği alındıktan sonra, 1 µmol CDP-kolin (i.s.v.) enjekte edilmiştir. İlaç enjeksiyonunu takiben 2., 5., 10., 20., 40., 60. ve 90. dakikalarda nesfatin-1 ölçümleri için kan örnekleri alınmış ve serumları ayrılmıştır. Veriler 5 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü ANOVA kullanılarak yapılmıştır. * p<0.05, bazal düzeylerden anlamlı olarak farklıdır.

Aç – Erkek Sıçanlarda İntraserebroventriküler Yolla Verilen CDP-Kolinin Serum Nesfatin-1 Düzeylerine Etkisi

CDP-kolinin açlık koşullarında serum nesfatin-1 düzeylerine olan etkisinde cinsiyet farkının olup olmadığını test etmek amacıyla yem alımları 24 saat önce kesilmiş erkek sıçanlara 1 µmol CDP-kolin i.s.v. yolla enjekte edilmiştir. Sonuçlar CDP-kolinin serum nesfatin-1 düzeylerini zamana bağlı olarak azalttığını göstermektedir. Serum nesfatin-1 düzeylerindeki azalma 40. ve 60. dakikalarda anlamlı bulunmuştur (Şekil-13).



Şekil-13: Aç bırakılmış erkek sıçanlarda intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolinin serum nesfatin-1 düzeylerine etkisi.

Deneyden 24 saat önce yemleri alınarak aç bırakılan ve sadece su alımına izin verilen erkek sıçanlara, bazal ölçüm için kan örneği alındıktan sonra, 1 µmol CDP-kolin (i.s.v.) enjekte edilmiştir. İlaç enjeksiyonunu takiben 2., 5., 10., 20., 40., 60. ve 90. dakikalarda nesfatin-1 ölçümleri için kan örnekleri alınmış ve serumları ayrılmıştır. Veriler 9 sıçanın ortalama ± standart hatası olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme tek yönlü ANOVA kullanılarak yapılmıştır. * p<0.05, bazal düzeylerden anlamlı olarak farklıdır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen bulgular, CDP-kolinin serum nesfatin-1 düzeylerini etkileyebildiğini göstermektedir. CDP-kolinin etkisi veriliş yoluna, cinsiyete ve açlık-tokluk koşullarına göre değişmektedir. Yem alımı serbest bırakılmış dişi hayvanlarda intravenöz yolla verilen ilaç, serum nesfatin-1 düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir etki oluşturmazken (Tablo-1), intraserebroventriküler yoldan verildiğinde serum nesfatin-1 düzeylerini artırmaktadır (Şekil-11). Buna karşılık açlık koşullarında CDP-kolinin nesfatin-1 düzeylerini azalttığı gözlenmiştir (Şekil-12, Şekil-13).

CDP-kolin vücudumuzda membran fosfolipidlerinin sentezi sırasında bir ara ürün olarak ortaya çıkan nükleotid yapıli bir moleküdür (1). Dışardan verildiğinde gerek kendisi ve gerekse nihai metabolitleri olan kolin ve sitidin aracılığı ile çok çeşitli fizyolojik ve farmakolojik etkiler oluşturabilmektedir. Çok sayıda deneysel ve klinik modelde karakterize edilmiş ve halen incelenmekte olan bu etkiler (4-6, 50), özellikle iskemi ve hipoksi koşullarındaki koruyucu rolüne odaklanırken, laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalarda ilacın kardiyovasküler ve endokrin sistem üzerine olan etkileri ortaya çıkarılmıştır. Merkezi ve periferik yolla verilen CDP-kolin kan basıncını artırmakta, hipotansiyonu düzeltmekte, normal ve uyarılmış koşullarda hipofizer hormonların salıverilmesini etkilemektedir (7, 8, 10, 11). Laboratuvarımızda yakın zamanda yapılmış olan bir çalışmada, intravenöz yolla verilen CDP-kolinin plazma vazopressin ve oksitosin düzeylerini artırdığı ve ayrıca, vazopressinerjik ve oksitosinerjik nöronlarda C-Fos aktivasyonunu uyardığı gösterilmiştir (12). CDP-kolin ayrıca, akut olarak verildiğinde plazma leptin düzeylerini artırmakta, ghrelin düzeylerini baskılamaktadır (13). Bununla uyumlu olarak, ilacın kronik kullanımında iştahı baskıladığı rapor edilmiştir (14).

Nesfatin-1 molekülü, prekürsör proteini NUCB2 (nucleobindin 2)'den türeyen, 82 aminoasitli, yakın zamanda tanımlanmış, adipozitlerde, gastrointestinal sistemde (özellikle midede) ve beyinde sentezlendiği ve dışardan verildiğinde akut olarak iştahı baskıladığı gösterilmiş anoreksijenik bir peptiddir (15). Ayrıca, sıçanlarda yapılan bir çalışmada, nesfatin-1'in, hipotalamusta paraventricüler ve supraoptik nükleuslardaki vazopressinerjik ve oksitosinerjik nöronlarda koeksprese olduğu rapor edilmiştir (16).

CDP-kolinin yukarıda kısaca belirtilen özellikleri, özellikle hipotalamik ve hipofizer hormon salıverilmesini içeren iştahla ilgili endokrin etkileri gözönüne alınarak dolaşımdaki nesfatin-1 düzeylerini etkileyebileceği öngörülmüştür. Gerçekten de

intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolin, tok hayvanlarda doza bağılı olarak serum nesfatin-1 düzeylerini artırmıştır. Çalışmada kullanılan 0.25 ve 0.5 µmol dozlarda gözlenen serum nesfatin-1 düzeylerindeki artış istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyine ulaşamazken, 1 µmol dozda ilacın oluşturduğu nesfatin-1 düzeylerindeki artışın 5. ve 10. dakikalarda anlamlı olduğu saptanmıştır. Bu doz, ilacın diğer endokrin ve kardiyovasküler etkilerinde anlamlı değişiklikler sergilediği dozla uyumludur (7, 8, 10, 11).

Diğer taraftan intravenöz yolla verilen ilacın serum nesfatin-1 düzeylerinde herhangi bir değişiklik ortaya çıkarmaması beklenen bir sonuç değildir. Çünkü CDP-kolin periferik yolla verildiğinde de plazma vazopressin ve oksitosin seviyelerini artırmak, kan basıncını yükseltmek ve hemorajik şok modelinde görülen hipotansiyonu düzeltmek gibi çeşitli etkiler sergileyebilmektedir (8, 10, 12, 80, 81). Bu durumda intravenöz enjeksiyonla istatistiksel açıdan anlamlı etkinin ortaya çıkmaması, etkin doz aralığının seçilememesi ve incelenmek üzere seçilen zaman aralıklarının yeterli olmaması ile ilgili olabilir.

İntraserebroventriküler yolla enjekte edilen CDP-kolinin tok hayvanlarda nesfatin-1 düzeylerini artırması peptidin anoreksijenik yapısı düşünüldüğünde oldukça mantıklıdır. Çünkü tok hayvanlarda nesfatin-1 artışı iştahı baskılayacak ve daha fazla besin alımını engelleyecektir. Ayrıca CDP-kolinin iştahı baskıladığı da gözönünde bulundurulduğunda, bu etkide nesfatin-1 düzeylerindeki artışın da aracılığı olduğu ileri sürülebilir.

Çalışmamızda, besin alımı serbest bırakılan dişi hayvanlarda bazal serum nesfatin-1 düzeyleri 10-15 ng/ml arasında ölçülmüştür. Bu düzeyler literatürde belirtilen bazal düzeylerden (0,5-4 ng/ml) daha yüksektir (74, 85). Ayrıca bireysel varyasyonların fazla olduğu da gözlenmiştir. Nesfatin-1'in besin alımını etkileyen bir peptid olduğu da düşünüldüğünde, yukarıdaki gerekçelerle birlikte ilacın etkisinin açlık koşullarında da test edilmesi uygun bulunmuştur. İntravenöz yolla verildiğinde etki gözlenmemesi nedeniyle, açlık koşullarında CDP-kolin intraserebroventriküler yolla verilmiştir. CDP-kolin (1 µmol), deneyden 24 saat önce yem alımları sonlandırılmış dişi hayvanlarda serum nesfatin-1 düzeylerini düşürmüştür (Şekil-12). Bu etki tok sıçanlarda gözlenen etkinin tersidir (Şekil-11). Ancak açlık koşullarında iştahın daha fazla baskılanmasına gerek olmadığından gözlenen etkinin mantıklı olduğu düşünülebilir.

Açlık koşullarında merkezi sinir sisteminde asetilkolin salıverilmesi, leptin düzeyleri de dahil olmak üzere çeşitli adaptif değişiklikler olduğu raporlanmıştır (82, 83). Bu durumda açlık ve tokluk şartlarında ilacın etkisinde gözlenen farklılık bu adaptif

değişikliklerle bağlantılı olabilir. Ancak bu mekanizmalar henüz incelenmemiştir ve ileri çalışmalara gerek vardır.

Ayrıca, her ne kadar nesfatin-1 düzeylerinin dişi ve erkeklerde aynı olduğunu rapor eden bir çalışma mevcutsa da (79), nesfatin-1 ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, cinsiyet farklılığından da doğmuş olabilecek bazı farklı sonuçlar elde edildiği raporlanmıştır (84). Dişi sıçanların siklus dönemi endokrin parametrelerden etkilenen deney koşullarını değiştirebildiğinden, dişi seks hormonları bazı fizyolojik ve farmakolojik yanıtları etkileyebildiğinden, çalışmamızda, CDP-kolin etkisinin erkek sıçanlarda da incelenmesi ve dişi sıçanlardaki sonuçlarla karşılaştırılması gereklilik haline gelmiştir. Buna uygun olarak 24 saat önceden yem alımları sonlandırılarak aç bırakılmış erkek hayvanlarda da benzer şekilde, intraserebroventriküler yoldan verilen CDP-kolin (1 µmol), serum nesfatin-1 düzeylerini anlamlı olarak düşürmüştür (Şekil-13). Dişi sıçanlarda etki 2. dakikadan itibaren başlamış ve 90 dakika boyunca devam etmişken (Şekil-12), erkek sıçanlarda nesfatin-1 düzeylerindeki azalmanın 40. dakikadan itibaren anlamlılık seviyesine ulaştığı ve 90. dakikada geri dönmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil-13). Aynı yönde olmakla birlikte etkinin zaman profilinde erkek ve dişi farklılığı vardır.

Nesfatin-1, kemirgenlerde karanlık faz besin alımının yeni merkezi anoreksijenik modülatörüdür (70). Muhtemelen, besin alımının sadece akut olarak azalmasından değil, ayrıca vücut ağırlığının uzun süreli kontrolünden de sorumludur. Nesfatin-1'in anoreksijenik fonksiyonu, diğer pek çok iştah regülasyonu ile ilgili hormonun tersine, leptinden bağımsızdır (68, 69). Bu durum, obezite hastalarında sıklıkla görülen leptin direncinin sözkonusu olduğu metabolik şartlarda, nesfatin-1'in ilaç olarak kullanılabileceğini düşündürmesi açısından umut vericidir.

Çalışmamız, CDP-kolinin, nesfatin-1 düzeyleri üzerine etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Veriliş yolu, açlık-tokluk durumu, cinsiyet farkı gibi birçok değişken dikkate alınmış; farklı dozların, 7 veya 8 farklı zaman aralığında etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolinin serum nesfatin-1 düzeylerini etkilediği görülmüş; bu etkinin, açlık-tokluk koşullarına göre değiştiği saptanmıştır. Tokluk koşullarında dolaşımda nesfatin-1 düzeylerini artırırken, aç bırakılmış hayvanlarda ilacın etkisi nesfatin-1'i baskılamak şeklinde olmuştur. Cinsiyete bağlı olarak etkinin yönü değişmemiş, ancak etkinin başlama ve devam sürelerinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir.

CDP-kolin günümüzde birçok ülkede, başta serebral iskemi ve stroke olmak üzere, ayrıca çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde de başarı ile kullanılan, terapötik indeksi geniş, güvenli bir ilaçtır. Bu tez çalışması ile CDP-kolinin leptin ve ghrelin gibi iştah kontrolü ile ilgili bir diğer peptid olan nesfatin-1'in serum düzeylerini etkilediğinin gösterilmesi onun obezite tedavisinde de kullanım potansiyelini güçlendirmiştir.

KAYNAKLAR

1. WEISS GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci*, 56: 637-660, 1995.
2. FARBER SA, SAVCI V, WEI A, SLACK BE, WURTMAN RJ. Choline's phosphorylation in rat striatal slices is regulated by the activity of cholinergic neurons. *Brain Res*, 723 (1-2): 90-99, 1996.
3. SAVCI V, WURTMAN RJ. Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem*, 64 (1): 378-384, 1995.
4. CACABELOS R, ALVAREZ XA, FRANCO-MASIDE A, FERNANDEZ-NOVOA L, CAAMANO J. Effect of CDP-choline on cognition and immune function in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. *Ann. NY. Acad. Sci*, 16: 211-218, 1994.
5. D'ORLANDO KJ, SANDAGE BW. JR. Citicoline (CDP-choline): mechanism of action and effects in ischemic brain injury. *Neurol. Res*, 17: 281-264, 1995.
6. ADIBHATLA RM, HATCHER JF, LARSEN EC, CHEN X, SUN D, TSAO FH. CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A2 and CTP: phosphocholine cytidyltransferase after stroke. *J. Biol. Chem*, 281 (10): 6718-6725, 2006.
7. SAVCI V, CAVUN S, GOKTALAY G, ULUS IH. Cardiovascular effects of intracerebroventricularly injected CDP-choline in normotensive and hypotensive animals: the involvement of cholinergic system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 365: 388-398, 2002.
8. SAVCI V, GOKTALAY G, CANSEV M, CAVUN S, YILMAZ MS, ULUS IH. Intravenously injected CDP-choline increases blood pressure and reverses hypotension in haemorrhagic shock: effect is mediated by central cholinergic activation. *Eur. J. Pharmacol*, 468: 129-139, 2003.
9. YILMAZ MS, YALCIN M, SAVCI V. Cytidine 5'-diphosphocholine restores blood flow of superior mesenteric and adrenal arteries and prolongs survival time in haemorrhaged anaesthetised rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, 33: 415-420, 2006.
10. CAVUN S, SAVCI V, ULUS IH. Centrally injected CDP-Choline increases plasma vasopressin levels by central cholinergic activation. *Fundam. Clin. Pharmacol*, 18: 71-77, 2004.
11. CAVUN S, SAVCI V. CDP-choline increases plasma ACTH and potentiates the stimulated release of GH, TSH and LH: the cholinergic involvement. *Fundam. Clin. Pharmacol*, 18: 513-523, 2004.
12. EYIGOR O, COSKUN C, CAVUN S, SAVCI V. Intravenous CDP-choline activates neurons in supraoptic and paraventricular nuclei and induces hormone secretion. *Brain Res Bull*, 87: 286-294, 2012.
13. KIYICI DS. İntraserebroventriküler verilen CDP-kolinin serum ghrelin ve leptin düzeyleri üzerine etkisi (Doktora Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2013.
14. KILLGORE WDS, ROSS AJ, KAMIYA T, KAWADA Y, RENSHAW PF, YURGELUN-TODD DA. Citicoline affects appetite and cortico-limbic responses to images of high-calorie foods. *Int. J. Eat Disord*, 43: 6-13, 2010.
15. OH-I S, SHIMIZU H, SATOH T, OKADA S, ADACHI S, INOUE K, EGUCHI H, YAMAMOTO M, IMAKI T, HASHIMOTO K, TSUCHIYA T, MONDEN T,

- HORIGUCHI K, YAMADA M, MORI M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443 (7112): 709-712, 2006.
16. KOHNO D, NAKATA M, MAEJIMA Y, SHIMIZU H, SEDBAZAR U, YOSHIDA N, DEZAKI K, ONAKA T, MORI M, YADA T. 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, 2008.
 17. VALASSI E, SCACCHI M, CAVAGNINI F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18: 158-168, 2008.
 18. SPIEGELMAN BM, FLIER JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104: 531-543, 2001.
 19. FLIER JS. Obesity Wars: Molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116: 337-350, 2004.
 20. LAKHER MB, WURTMAN RJ. Molecular composition of the phosphatidylcholines produced by the phospholipid methylation pathway in rat brain in vivo. *Biochem J*, 244(2): 325-330, 1987.
 21. KENNEDY EP, WEISS SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem*, 222 (1): 193-214, 1956.
 22. MILLER BE, HOOK GE. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in activated alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 1 (2): 127-136, 1989.
 23. WIENTZEK M, MAN RY, CHOY PC. Choline glycerophospholipid biosynthesis in the guinea pig heart. *Biochem. Cell Biol*, 65 (10): 860-868, 1987.
 24. LOPEZ-COVIELLA I, AGUT J, SAVCI V, ORTIZ JA, WURTMAN RJ. Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J. Neurochem*, 65: 889-894, 1995.
 25. HAINES DS, TOKMAKJIAN SD. Actions of dietary orotic acid on liver synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rats. *Biochem Cell Biol*, 65 (2): 105-111, 1987.
 26. G-COVIELLA IL, WURTMAN RJ. Enhancement by cytidine of membrane phospholipid synthesis. *J Neurochem*, 59 (1): 338-343, 1992.
 27. WURTMAN RJ, REGAN M, ULUS IH, YU L. Effect of oral CDP-choline on plasma choline and uridine levels in humans. *Biochem. Pharmacol*, 60: 989-992, 2000.
 28. ZEISEL SH. Choline: essential for brain development and function. *Adv Pediatr*, 44: 263-295, 1997.
 29. CERMAK JM, HOLLER T, JACKSON DA, BLUSZTAJN JK. Prenatal availability of choline modifies development of the hippocampal cholinergic system. *Faseb J*, 12 (3): 349-357, 1998.
 30. BLUSZTAJN JK, WURTMAN RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science*, 221 (4611): 614-620, 1983.
 31. ULUS IH, MILLINGTON WR, BUYUKUYSAL RL, KIRAN BK. Choline as an agonist: determination of its agonistic potency on cholinergic receptors. *Biochem. Pharmacol*, 37: 2747-2755, 1988.
 32. ALKONDON M, PEREIRA EF, CORTES WS, MAELICKE A, ALBUQUERQUE EX. Choline is selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur. J. Neurosci*, 9 (12): 2734-2742, 1997.
 33. YASHIMA K, TAKAMATSU M, OKUDA K. Intestinal absorption of cytidine

- diphosphate choline and its changes in the digestive tract. *J Nutr Sci Vitaminol*, 21 (1): 49-60, 1975.
34. DINSDALE JR, GRIFFITHS GK, ROWLANDS C, CASTELLO J, ORTIZ JA, MADDOCK J, AYLWARD M. Pharmacokinetics of [¹⁴C]-CDP-choline. *Arzneim.-Forsch./Drug Res*, 33 (7A): 1066-1070, 1983.
 35. VAN HEUSDEN GP, VANDEN BOSCH H. Utilization of disaturated and unsaturated phosphatidylcholine and diacylglycerols by cholinephosphotransferase in rat lung microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 711 (2): 361-368, 1982.
 36. FRESTA M, WEHRLI E, PUGLISI G. Enhanced therapeutic effect of cytidine-5'-diphosphate choline when associated with GM1 containing small liposomes as demonstrated in a rat ischemia model. *Pharm Res*, 12 (11): 1769-1774, 1995.
 37. GALLETTI P, DE ROSA M, COTTICELLI MG, MORANA A, VACCARO R, ZAPPIA V. Biochemical rationale for the use of CDP-choline in traumatic brain injury: pharmacokinetics of the orally administered drug. *J Neurol Sci*, 103: 19-25, 1991.
 38. ROMERO A, SERRATOSA J, SACRISTAN A, ORTIZ JA. High-resolution autoradiography in mouse brain 24 h after radiolabelled CDP-choline administration. *Arzneimittelforschung*, 33 (7A): 1056-1058, 1983.
 39. ROMERO A, SERRATOSA J, SACRISTAN A, ORTIZ JA. High-resolution autoradiography in mouse brain and cerebellum 10 days after radiolabelled CDP-choline administration. *Arzneimittelforschung*, 33 (7A): 1058-1060, 1983.
 40. BABB SM, APPELMANS KE, RENSHAW PF, WURTMAN RJ, COHEN BM. Differential effect of CDP-choline on brain cytosolic choline levels in younger and older subjects as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Psychopharmacology*, 127 (2): 88-94, 1996.
 41. COHEN EL, WURTMAN RJ. Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci*, 16 (7): 1095-1102, 1975.
 42. KOPPEN A, KLEIN J, HOLLER T, LOFFELHOLZ K. Synergistic effect of nicotinamide and choline administration on extracellular choline levels in the brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 266 (2): 720-725, 1993.
 43. HAUBRICH DR, WANG PF, CLODY DE, WEDEKING PW. Increase in rat brain acetylcholine induced by choline or deanol. *Life Sci*, 17 (6): 975-980, 1975.
 44. PAPKE RL, BENCHERIF M, LIPPIELLO P. An evaluation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation by quaternary nitrogen compounds indicates that choline is selective for the alpha 7 subtype. *Neurosci Lett*, 213 (3): 201-204, 1996.
 45. ARSLAN BY, ULUS IH, SAVCI V, KIRAN BK. Effects of intracerebroventricular injected choline on cardiovascular functions and sympathoadrenal activity. *J Cardiovasc Pharmacol*, 17 (5): 814-821, 1991.
 46. GUARINI S, TAGLIAVINI S, FERRARI W, BERTOLINI A. Reversal of haemorrhagic shock in rats by cholinomimetic drugs. *Br J Pharmacol*, 98 (1): 218-224, 1989.
 47. ULUS IH, ARSLAN BY, SAVCI V, KIRAN BK. Restoration of blood pressure by choline treatment in rats made hypotensive by haemorrhage. *Br J Pharmacol*, 116 (2): 1911-1917, 1995.
 48. YILMAZ MS. Sıçanda deneysel miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modelinde CDP-kolin ve metabolitlerinin etkileri (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2005.

49. CANSEV M. CDP-kolinin kardiyovasküler, metabolik ve nöroendokrin etkileri (Uzmanlık Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2003.
50. ADIBHATLA RM, HATCHER JF. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 70 (2): 133-139, 2002.
51. ADIBHATLA RM, HATCHER JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*, 40 (3): 376-387, 2006.
52. DIXON CE, MA X, MARION DW. Effects of CDP-choline treatment on neurobehavioral deficits after TBI and on hippocampal and neocortical acetylcholine release. *J Neurotrauma*, 14 (3): 161-169, 1997.
53. AGUT J, ORTIZ JA. Age-related changes in memory and their pharmacologic modulation. *Ann N Y Acad Sci*, 640: 295-297, 1991.
54. TEATHER LA, WURTMAN RJ. Dietary cytidine (5')-diphosphocholine supplementation protects against development of memory deficits in aging rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27 (4): 711-717, 2003.
55. BRUHWYLER J, LIEGEOIS JF, GECZY J. Facilitatory effects of chronically administered citicoline on learning and memory processes in the dog. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22 (1): 115-128, 1998.
56. SPIERS PA, MYERS D, HOCHANADEL GS, LIEBERMAN HR, WURTMAN RJ. Citicoline improves verbal memory in aging. *Arch Neurol*, 53 (5): 441-448, 1996.
57. HAMURTEKIN E, GURUN MS. The antinociceptive effect of centrally administered CDP-choline on acute pain models in rats: The involvement of cholinergic system. *Brain Research*, 1117: 92-100, 2006.
58. HAMURTEKIN E, BAGDAS D, GURUN MS. Possible involvement of supraspinal opioid and GABA receptors in CDP-choline-induced antinociception in acute pain models in rats. *Neurosci Lett*, 420 (2): 116-121, 2007.
59. BRAILOIU GC, DUN SL, BRAILOIU E, INAN S, YANG J, CHANG JK, DUN NJ. Nesfatin-1: Distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*, 148 (10): 5088-5094, 2007.
60. FOO K, BRISMAR H, BROBERGER C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*, 156 (3): 563-579, 2008.
61. GOEBEL M, STENGEL A, WANG L, LAMBRECHT NW, TACHE Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett*, 452 (3): 241-246, 2009.
62. INCHOFF T, STENGEL A, PETER L, GOEBEL M, TACHE Y, BANNERT N, WIEDENMANN B, KLAPP BF, MONNIKES H, KOBELT P. Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides*, 31 (2): 257-262, 2010.
63. STENGEL A, GOEBEL M, YAKUBOV I, WANG L, WITCHER D, COSKUN T, TACHE Y, SACHS G, LAMBRECHT NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*, 150: 232-238, 2009.
64. ZHANG AQ, LI XL, JIANG CY, LIN L, SHI RH, CHEN JD, OOMURA Y. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol*, 16 (14): 1735-1741, 2010.
65. CUI H, SOHN JW, GAUTRON L, FUNAHASHI H, WILLIAMS KW, ELMQUIST JK, LUTTER M. Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor

- pathway in the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol*, 520 (18): 4168-4183, 2012.
66. BECKERS S, ZEGERS D, VAN GAAL LF, VAN HUL W. The role of the leptin-melanocortin signalling pathway in the control of food intake. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 19 (4): 267-287, 2009.
 67. MIMÉE A, SMITH PM, FERGUSON AV. Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 302 (11): 1297-1304, 2012.
 68. SHIMIZU H, OH-I S, HASHIMOTO K, NAKATA M, YAMAMOTO S, YOSHIDA N, EGUCHI H, KATO I, INOUE K, SATOH T, OKADA S, YAMADA M, YADA T, MORI M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: The leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 150 (2): 662-671, 2009.
 69. SHIMIZU H, OHSAKI A, OH-I S, OKADA S, MORI M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*, 30 (5): 995-998, 2009.
 70. STENGEL A, GOEBEL M, WANG L, RIVIER J, KOBELT P, MONNIKES H, LAMBRECHT NW, TACHE Y. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: Differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology*, 150 (11): 4911-4919, 2009.
 71. SHIMIZU H, OH-I S, MORI M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocr J*, 56: 537-543, 2009.
 72. SU Y, ZHANG J, TANG Y, BI F, LIU JN. The novel function of nesfatin-1: antihyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 1039-1042, 2010.
 73. YANG M, ZHANG Z, WANG C, LI K, LI S, BODEN G, LI L, YANG G. Nesfatin-1 action in the brain increases insulin sensitivity through Akt/AMPK/TORC2 pathway in diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 61 (8): 1959-1968, 2012.
 74. ZHANG Z, LI L, YANG M, LIU H, BODEN G, YANG G. Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120 (2): 91-5, 2011.
 75. PAN W, HSUCHOU H, KASTIN AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*, 28 (11): 2223-2228, 2007.
 76. YOSTEN GL, SAMSON WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297 (2): 330-336, 2009.
 77. ANGALONE T, FILICE E, PASQUA T, AMODIO N, GALLUCCIO M, MONTESANTI G, QUINTIERI AM, CERRA MC. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: Identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci*, 70 (3): 495-509, 2013.
 78. PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edition, Academic Press Inc, California, page 92-101, 1986.
 79. XU L, BLOEM B, GASZNER B, ROUBOS EW, KOZICZ T. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *J. Neuroscience*, 162 (4): 1141-1149, 2009.
 80. LOPEZ G, COVIELLA I, AGUT J, VON BORSTEL R, WURTMAN RJ. Metabolism of cytidine (5')-diphosphocholine (CDP-choline) following oral and intravenous administration to the human and the rat. *Neurochem. Int*, 11: 293-297, 1987.

81. PARONI R, CIGHETTI G, DEL PUPPO M, KIENLE MG. Evidence for a different metabolic behavior of cytidine diphosphate choline after oral and intravenous administration to rats. *Pharmacol Res Commun*, 17: 805-829, 1985.
82. WATHEN AB, WEST ES, LYDIC R, BAGHDOYAN HA. Olanzapine causes a leptin-dependent increase in acetylcholine release in mouse prefrontal cortex. *Sleep*, 35 (3): 315-323, 2012.
83. POPOVIC V, DUNTAS LH. Leptin TRH and ghrelin: Influence on energy homeostasis at rest and during exercise. *Horm Metab Res*, 37 (9): 533-537, 2005.
84. STENGEL A, MORI M, TACHE Y. The role of nesfatin-1 in the regulation of food intake and body weight: recent developments and future endeavors. *Obesity Reviews Etiology and Pathophysiology*, 14: 859-870, 2013.
85. CATAK Z, AYDIN S, SAHIN I, KULOGLU T, AKSOY A, DAGLI AF. Regulatory neuropeptides (ghrelin, obestatin and nesfatin-1) levels in serum and reproductive tissues of female and male rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Neuropeptides*, 48: 167-177, 2014.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, her koşulda anlayış ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Vahide SAVCI'ya, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. R. Levent BÜYÜKUYSAL'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN'e, Prof. Dr. Sinan ÇAVUN'a, Doç. Dr. Gökhan GÖKTALAY'a, Doç. Dr. Mehmet CANSEV'e, Doç. Dr. M. Sertaç YILMAZ'a, teknik konularda kurtarıcımız olan ve nesnelere farklı gözle bakmayı öğreten Kimyager Sami AYDIN'a, bilgi ve emeğini asla esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Betül ÇAM'a, yardımlarından dolayı Veteriner Hekim Deniz BAĞDAŞ'a, ayrıca tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, son olarak da, her konuda bana destek olan sevgili eşime, kızıma ve bugünlere ulaşabilmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anneme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

6 Eylül 1979 yılında Bursa'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Bursa'da tamamladım. 1996-2000 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde okudum. 2010 yılından bu yana, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi almaktayım. Evliyim ve bir çocuk sahibiyim.