



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



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

DUYGU GÖK YURTSEVEN

DOKTORA TEZİ

BURSA-2018





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



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

Duygu GÖK YURTSEVEN

(DOKTORA TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Özhan EYİGÖR**

113S377-TÜBİTAK

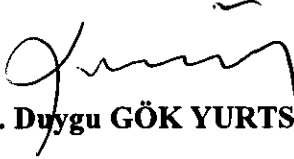
BURSA-2018

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum;






“Nesfatin 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.


Araş. Gör. Duygu GÖK YURTSEVEN
05.01.2018

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Duygu Gök Yurtseven tarafından hazırlanan “Nesfatin Nöronları Üzerinde Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması” konulu doktora tezi 05/01/2018 günü, 11:00-13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Duygu GÖK YURTSEVEN

	Adı Soyadı	İmza
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Özhan Eyigör	
Üye	Prof. Dr. F. Zehra Minbay	
Üye	Prof. Dr. A. Çevik Tufan	
Üye	Doç. Dr. M. İlker Kafa	
Üye	Yard. Doç. Dr. Bahar Sunay	

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

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU

Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

04/12/2017

Adı Soyadı: Duygu GÖK YURTSEVEN

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Çalışmamızın konusu; hipotalamusun birçok endokrin ve peptiderjik sistemi üzerinde etki gösteren eksitator aminoasit nörotransmitterlerinin başında gelen glutamatın, nesfatin-1 nöronları üzerindeki etkilerinin gösterilmesidir.

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</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

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR

İmza:



İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak

ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Enerji Dengesi.....	5
2.2 Besin Alımının Nöroendokrin Kontrolü	6
2.3. Besin Alımında Rol Oynayan Peptitler	11
2.3.1. Hipotalamustan Salgılanan Oreksijenik Nöropeptitler.....	13
2.3.2. Hipotalamustan Salgılanan Anoreksijenik Peptitler	15
2.4. Nesfatin-1	17
2.4.1. Nesfatin-1 Geninin Keşfi ve Moleküler Yapısı	17
2.4.2. Nesfatin-1'in Sinyal İletimi	19
2.4.3. NUCB2/Nesfatin-1'in Ekspresyonu.....	19
2.4.3.1. Nesfatin-1'in Hücresel Düzeyde Ekspresyonu	19
2.4.3.2. Nesfatin-1'in Merkezi Ekspresyonu.....	19
2.4.3.3. Nesfatin-1'in Periferel Dokulardaki Ekspresyonu	21
2.4.4. Besin Alımında Nesfatin-1'in Etkileri	21
2.4.4.1. Merkezi Etkileri	21
2.4.4.2. Periferel Etkileri	23
2.4.5. Nesfatin-1'in Beslenmeyi Düzenleyici Sistemlerle Olan İlişkisi.....	24
2.5. Glutamat ve Hipotalamik Glutamaterjik Sistem	26
2.5.1. NMDA Reseptörleri	27
2.5.2. AMPA Reseptörleri.....	28
2.5.3. Kainat Reseptörleri.....	29
2.6. Nöronal Aktivasyon Belirteçleri	30
2.6.1. Aktivasyon belirteci olarak kullanılan proteinler	30
2.6.1.1. c-Fos.....	30
2.6.1.2. Fosforile CREB	31

2.6.1.3. Fosforile STAT	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Deney Hayvanları.....	34
3.2. Dokuların İmmünohistokimyasal İşaretlemeler için Hazırlanması.....	34
3.3. İmmünohistokimyasal İşlemlerde Takip Edilen Genel Kurallar	35
3.4. Çalışmada Kullanılan Antikorlar için Uygun Dilüsyonların ve İnkübasyon Koşullarının Belirlenmesi.....	36
3.5. Deney Prosedürü:.....	39
3.5.1. Özgün Amaç 1: Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün araştırılması	39
3.5.2. Özgün Amaç 2: Nesfatin-1 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birim protein ekspresyonlarının gösterilmesi	43
3.6. Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemelerin Değerlendirilmesi	47
4.2. Nesfatin-1 Nöronlarının Hipotalamustaki Lokalizasyonu	47
4.3. Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün belirlenmesi.....	49
4.3.1. Farklı glutamat agonistlerinin (KA, AMPA ve NMDA) nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisi.....	49
4.3.1.1. Glutamat agonistleri ile uyarılan nesfatin-1 nöronlarında phospho CREB'in ekspresyonu	49
4.3.1.2. Glutamat agonistleri ile uyarılan nesfatin-1 nöronlarında pSTAT5'in ekspresyonu	51
4.3.1.3. Glutamat agonistleri ile uyarılan SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos'un ekspresyonu.....	52
4.3.1.4. Glutamat agonistleri ile uyarılan ARC'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos'un ekspresyonu.....	54
4.3.1.5. Glutamat agonistleri ile uyarılan PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos'un ekspresyonu.....	56
4.3.2. Glutamat agonistlerinin etki düzeylerinin karşılaştırılması	58
4.3.3. Glutamat agonistlerinin cinsiyete bağlı etkilerinin karşılaştırılması	60
4.3.4. Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonunda Glutamat Antagonistlerinin Etkisi.....	61
4.3.5. Nesfatin-1 Nöronlarında Glutamat Reseptör Alt Birimlerinin Ekspresyonu	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
6. KAYNAKLAR	86
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	104

8. EKLER.....	106
8.1. Şekil Listesi	106
8.2. Tablo Listesi.....	108
9. TEŞEKKÜR	110
10. ÖZGEÇMİŞ.....	111



TÜRKÇE ÖZET

“Nesfatin-1 Nöronları Üzerinde Glutamaterjik Sistem Etkilerinin İmmünohistokimyasal Olarak Araştırılması”

Nesfatin-1, besin alımını engelleyerek enerji metabolizmasını düzenleyen anoreksijenik bir peptit olarak ilk defa hipotalamus ve soliter traktusta yerleşik nöronlarda belirlenmiştir. Nesfatin-1 nöronlarının çoğunluğu hipotalamusun paraventriküler (PVN), supraoptik (SON) ve arkuat çekirdekleri (ARC) ile lateral hipotalamik alanda (LHA) yoğunlaşmıştır. Çalışmamızda; hipotalamusun birçok endokrin ve peptiderjik sistemi üzerinde etki gösteren eksitator aminoasit nörotransmitterlerinin başında gelen glutamatın, nesfatin-1 nöronları üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlandı. Bu doğrultuda iki özgün amaç belirlendi. Özgün amaç 1 doğrultusunda nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün araştırılması hedeflendi. Çalışmalarda hipotalamusun SON, ARC ve PVN’de yerleşik nesfatin-1 nöronları incelendi. Glutamat agonistlerinin etkilerini belirlemek üzere, kainik asit (2.5 mg/kg), AMPA (5 mg/kg) ve NMDA (100 mg/kg), kontrol grupları için salın, antagonist olarak CNQX (2 mg/kg) ve MK801 (1 mg/kg) enjeksiyonu yapılan dişi ve erkek sıçanları içeren deney grupları oluşturuldu. Nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos, pCREB ve pSTAT proteinlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Agonist enjeksiyonları sonrasında aktive olan nöron sayısındaki anlamlı artış, hem dişi hem de erkek deneklerde görülürken bu etkilerde cinsiyetler arası farklılıklar belirlendi. Ayrıca, her üç agonistin enjeksiyonlarından önce özgün antagonist uygulanması, her üç çekirdekte aktive olan nesfatin-1 nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtı. Glutamat agonistlerinin nesfatin-1 nöronlarındaki pCREB ekspresyonunu değiştirmediği, pSTAT ekspresyonunu ise tetiklemediği gösterildi. Özgün amaç 2 kapsamında ise nesfatin-1 nöronlarında glutamat reseptör alt ünitelerine ait proteinlerin ekspresyonları ikili immünofloresans yöntemi ile araştırıldı. Sonuçlar, nesfatin-1 nöronlarında homomerik ya da heteromerik fonksiyonel reseptör kanalları oluşturabilecek glutamat reseptör alt birimlerinin eksprese olduklarını gösterdi. Sonuç olarak, endojen glutamatın reseptörlerine bağlanarak nesfatin-1 nöronlarını aktive ettiği, bu etkide erkek ile dişi denekler arasında cinsiyete bağlı farklı etkileşimlerin var olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Nesfatin-1, glutamat, kainik asit, c-Fos, sıçan

İNGİLİZCE ÖZET

“Immunohistochemical Investigation of Glutamatergic System Effects on Nesfatin-1 Neurons”

Nesfatin-1 was first identified as an anorexigenic peptide which regulates the energy metabolism by suppressing food intake in neurons located in the hypothalamus and solitary tractus. The majority of nesfatin-synthesizing neurons is concentrated in the paraventricular (PVN), supraoptic (SON) and arcuate nuclei (ARC) of the hypothalamus, as well as in the lateral hypothalamic area (LHA). In our study; it was aimed to show the effects of glutamate which the predominant of excitatory amino acid neurotransmitters acting on many endocrine and peptidergic systems of the hypothalamus, on nesfatin-1 neurons. Two specific aims were proposed in this direction. In the first specific aim, the assessment of the role of the glutamatergic system in the regulation of the nesfatin-1 neurons was aimed. In these studies, the nesfatin-1 neurons that are localized in the hypothalamic SON, ARC and PVN were examined. In order to determine the effects of glutamate agonists, experimental groups were formed containing male and female rats which were injected with kainic acid (2.5 mg/kg), AMPA (5 mg/kg) and NMDA (100 mg/kg), saline for control groups and CNQX (2 mg/kg) and MK801 (1 mg/kg) as antagonists. Expressions of c-Fos, pCREB and pSTAT proteins in nesfatin-1 neurons were assessed. The significant increase in the number of activated neurons after agonist injections were observed both in female and male subjects and these effects were found to be sexually dimorphic. In addition, treatment with specific antagonists before each of the three agonist injections caused a statistically significant reduction in the number of activated nesfatin-1 neurons in all three nuclei. It was shown that glutamate agonists were ineffective in the changing of pCREB expression in the nesfatin-1 neurons as well as triggered no pSTAT5 expression. In the second specific aim, the expression of glutamate receptor subunits proteins in the nesfatin-1 neurons was investigated by using dual immunofluorescence technique. The results showed that the glutamate receptor subunits, which may form homomeric or heteromeric functional receptor channels were expressed in the nesfatin-1 neurons. As a result, it was determined that there are different sex-related interactions between male and female subjects in which the endogenous glutamate binds to its receptors and activates nesfatin-1 neurons.

Key Words: Nesfatin-1, glutamate, kainic acid, c-Fos, rat

1. GİRİŞ

Besin alımı, merkezi olarak üretilen hormonal sinyallerle periferik olarak üretilen hormonal ve nöronal sinyallerin birlikteliğiyle düzenlenen komplike bir mekanizmadır. Bu mekanizma merkezi sinir sisteminde yer alan çok çeşitli nöropeptit ve nörotransmitter sistemin kontrolü altındadır. Karakteristik olarak iştahın kontrol edilmesi ve enerji homeostazisinin düzenlenmesi gibi fizyolojik aktivitelerde yer alan bu nöropeptitlerin çoğunun, asıl olarak nöronal sinyal yollarında rol aldığı düşünülmektedir. Organizmanın temel işlevlerinin kontrolü ve hemostazisinde kilit rol oynayan merkezi sinir sistemi bölümü hipotalamustur. Hipotalamusta yer alan peptiderjik sistemlerin besin alımının kontrolündeki kompleks bağlantıları ve düzenleyici faktörleri son yıllarda yoğun araştırma konusu olmuştur. Tez çalışmasının konusu olan endojen bir protein olarak bulunan nesfatin-1 peptidi besin alımını baskılayan hipotalamik nöropeptit olarak ilk kez 2006 yılında tanımlanmıştır (Oh-I ve ark., 2006).

NEFA/NUCB2 (nükleobindin 2) prekürsör proteininden türeyen nesfatin-1, 82 aminoasite sahip anoreksijenik bir protein molekülüdür (Oh-I ve ark., 2006; Stengel ve Tache, 2010). Nesfatin-1'in, periferik ya da merkezi yolla deneklere uygulandığında besin alımının baskılandığı ve dolayısıyla vücut ağırlık kaybına yol açtığı gösterilmesiyle birlikte bu peptidin iştahı kontrol eden yolaktaki önemi ortaya çıkmıştır. Yapılan ilk immünohistokimyasal çalışmalar nesfatin-1 proteininin beslenmenin santral düzenlenmesinde rol alan hipotalamik çekirdeklerden arkuat çekirdek (ARC), paraventriküler çekirdek (PVN), supraoptik çekirdek (SON) ve lateral hipotalamik alan (LHA) ile diğer beyin bölgelerindeki nöron gruplarında lokalize olduğunu göstermiştir. Wistar cinsi erkek sıçanlarda yapılan doz bağımlı çalışmalarda bu molekülün beyine intraserebroventriküler enjeksiyonu ile vücutta yiyecek alımının ve vücut ağırlığının azaldığı gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006).

Fareler üzerinde yapılan bir başka araştırmada ise nesfatin-1'in altı gün boyunca tekrarlayan periyotlardaki intraperitoneal doz enjeksiyonları ile besin alımının 3 saat boyunca baskılandığı, vücut kütlesinin azalmasına yol açtığı belirlenmiştir (Shimizu ve ark., 2009). Deneklere nesfatin-1 antiserumu uygulandığında, kontrollere göre deneklerde besin alımı ile kilonun arttığı gözlemlenmiştir. Beslenme yetersizliğinde nesfatin-1'in serum seviyesinin giderek azaldığı, tekrar beslenmenin sağlanmasıyla nesfatin-1 seviyesinin normale döndüğü bildirilmiştir. Nesfatin-1'in periferik uygulanması sonrasında kan-beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir (Pan ve ark., 2007; Price ve ark., 2007). Bu sonuçlar aslında endojen nesfatin-1'in anoreksijenik düzenlenmeye aracılık ettiğini göstermektedir.

Hipotalamik paraventriküler ve supraoptik çekirdekte yer alan magnosellüler nöroendokrin nöronlarda, vazopressin ve oksitosin ile nesfatin-1'in ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (Kohno ve ark., 2008). Benzer şekilde parvosellüler nöroendokrin nöronlarda büyüme hormonunu salgılayıcı hormon (GHRH), nörotensin, somatostatin, kortikotropin salgılayıcı hormon ve tirotropin salgılayıcı hormon ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonu, arkuat nukleus da pro-opiomelanokortin (POMC) ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonu, lateral hipotalamus da melanin yoğunlaştırıcı hormon (MCH) ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonları ikili immunohistokimya tekniği kullanılarak gösterilmiştir (Foo ve ark., 2008). c-Fos immünreaktivitesinin nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanıldığı bir çalışmada, açlık sonrası tekrar beslenen sıçanların hipotalamik paraventriküler ve supraoptik çekirdeklerinde lokalize nesfatin-1 nöronlarının aktive oldukları gösterilmiştir (Kohno ve ark., 2008). Bu lokalizasyon sonuçları, NUCB2/Nesfatin-1 mRNA'sı ve immnoreaktivitesini araştıran çoğu araştırmacı tarafından doğrulanmıştır (Brailoiu ve ark., 2007, Foo ve ark., 2008; Goebel ve ark., 2009; Goebel ve ark., 2011; Kohno ve ark., 2008,).

Hipotalamusun birçok endokrin ve peptiderjik sistemi üzerinde etki gösteren glutamat, sinaptik mekanizmalar aracılığıyla hipotalamustaki neredeyse tüm nöronları etkilemektedir. Eksitatör amino asit nörotransmitterlerinin başında gelen glutamatın, nöroendokrin sistemlerin ve hipotalamus-hipofiz-endokrin sistem aksının düzenlenmesinde önemli rolü vardır (Brann ve ark., 1994; Brann ve ark., 1995). Glutamat reseptörleri, eksitatör sinaptik iletişime aracılık eden membran proteinleridir. Glutamatın iki farklı reseptör üst ailesinden biri olan iyonotropik

glutamat reseptörleri (diğeri metabotropik glutamat reseptörleri), iyon-özgül reseptör kanalları oluştururlar (Hollmann ve Heinemann 1994). Glutamat agonistleri, seçici olarak farklı tipteki glutamat reseptörlerine bağlanarak taşıdıkları uyarıyı nöronlara aktarırlar ve nöronal aktivasyonu sağlarlar. Aktive olan nöronların belirlenmesinde kullanılan çeşitli belirteçler mevcuttur. c-Fos, pSTAT (sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri) ve pCREB (c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein) proteinleri de nöronal aktivasyonu belirlemede belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu belirteçlerden birinin ya da birden fazlasının, uyarı karşısında nöron çekirdeklerinde gösterilmesi, o nöronal sistemin aktive olduğunu göstermesi ve bu aktivasyonda yer alan farklı hücre içi yolların belirlenebilmesi açısından önemlidir.

Nesfatin-1 nöronlarını kontrol eden nörotransmitter sistemlerle ilgili bilginin çok kısıtlı olması ve de bu nöronların glutamaterjik sistem aracılığıyla kontrol edilebilirliği ile ilgili verilerin literatürde olmaması sebebiyle; tez projesi kapsamında 'Glutamaterjik sistem nesfatin-1 nöronlarının regülasyonundaki etkisini fonksiyonel glutamat reseptörlerine bağlanarak gösterir' hipotezi test edilmiş, bu kapsamda belirlenen özgün amaçlara aşağıda değinilmiştir.

Özgün Amaç 1: Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün araştırılmasını kapsar. Bu amaca yönelik çalışmalarda farklı glutamat agonistlerinin (Kainik Asit, AMPA ve NMDA) nesfatin-1 nöronları üzerindeki aktive edici etkileri, ikili immünohistokimya yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Glutamat agonistlerinin verildiği deneklerden elde edilen kesitlerde, c-Fos, pCREB ve pSTAT immünreaktivitesinin varlığı nöronal aktivasyonun gösterilmesinde belirteç olarak kullanılmıştır. Özgün Amaç 2: Nesfatin-1 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birimi protein ekspresyonlarının (Kainat için GluK1-3, GluK5; AMPA için GluA1-4, NMDA için GluN1, GluN2A) ikili immünofloresans yöntemi ile araştırılmasını oluşturmaktadır. Bu reseptörlerin nesfatin-1 nöronlarında eksprese edildiklerinin belirlenmesi, glutamatın nesfatin-1'in sentez ve salıverilmesinde direkt olarak rol oynadığını göstermesi açısından önemlidir. Her iki amaca yönelik çalışmalarda dişi ve erkek denekler kullanılarak cinsiyetler arası olası farklılıklar da araştırılmıştır.

Tez kapsamında yer alan çalışmaların beklenildiği gibi sonuçlanması, nesfatin-1 literatürüne önemli katkı sağlamanın yanında, elde edilen verilere

dayanarak fizyolojik ve farmakolojik ileri çalışmaların planlanmasında öncü olabilecektir. Daha geniş perspektifte bakıldığında, besin alımıyla ilgili obezite veya anoreksi benzeri patolojik bozuklukların tedavisine yönelik oluşturulacak stratejilerin belirlenmesinde kullanılacak temel bilgilere katkı sağlamış olacağından, proje çıktılarının önemli bir düzeyde özgün değere sahip olduğu düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

Beslenme ve enerji metabolizması, canlıların yaşamlarını sürdürmesinde temel ve yaşamsal bir süreçtir. Enerji dengesinin sürdürülmesi, mide, beyin ve yağ dokusu arasındaki karşılıklı etkileşimi içeren karmaşık ve dinamik bir süreçle sağlanmaktadır. Bu üç majör organ arasındaki iletişimi, çeşitli peptitleri ve hormonları içeren parasempatik, sempatik sistemden oluşan bir ağ yönetmektedir (Crespo ve ark., 2014).

2.1. Merkezi Sinir Sistemi ve Enerji Dengesi

Açlık, iştah ve hedonik hislerle uyarılan beslenme davranışı, homeostatik bir süreçle kontrol edilir. Vücut ağırlığının ve içeriğinin uzun süre sabit kalması için besinlerden sağlanan enerji alımının enerji tüketimi ile dengede ve de enerji depolarının beyin tarafından belirlenmiş olması gerekir.

Beyne bilgi taşıyan metabolik sinyallerin doğasını anlamak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. ‘Glukostatik hipotez’e göre; açlık durumunda kan glikozundaki düşüş yemek yemeyi tetiklerken, plazma glikoz düzeyindeki artış beslenmeyi sonlandırır (Mayer, 1952). Kennedy (1953) tarafından önerilen ‘adipositik modele’ göre, adipoz doku tarafından salgılanan faktörler beyni etkileyerek yiyecek alımını ve enerji harcanmasını kontrol eder (Kennedy, 1953). Özellikle yağ dokusu ile ilişkili olan leptin, insülin gibi metabolik hormonların hipotalamusu etkileyerek enerji metabolizmasında önemli roller üstlendiği kanıtlanmıştır (Chua ve ark., 1996). Öte yandan, gastrointestinal kanaldan gelen nöronal ve hormonal sinyaller, vücut ağırlığı ve adipoziteyi kısmen etkilese de açlık ve tokluk durumunda yiyecek alımı ve metabolik hızı direkt olarak etkilemektedir (Ahima ve Antwi, 2008).

Açlık fizyolojik, iştah psikolojik bir olgudur (Carola ve ark., 1990). Açlık bir sonraki beslenmeye kadar olan yiyecek yoksunluğu hissi olarak tanımlanırken, iştah spesifik yiyeceklere karşı duyulan his, yemek yemeyi sürdürme arzusu olarak tanımlanır (Sorensen ve Moller, 2003). Doyma veya doygunluk, yemek sonrası

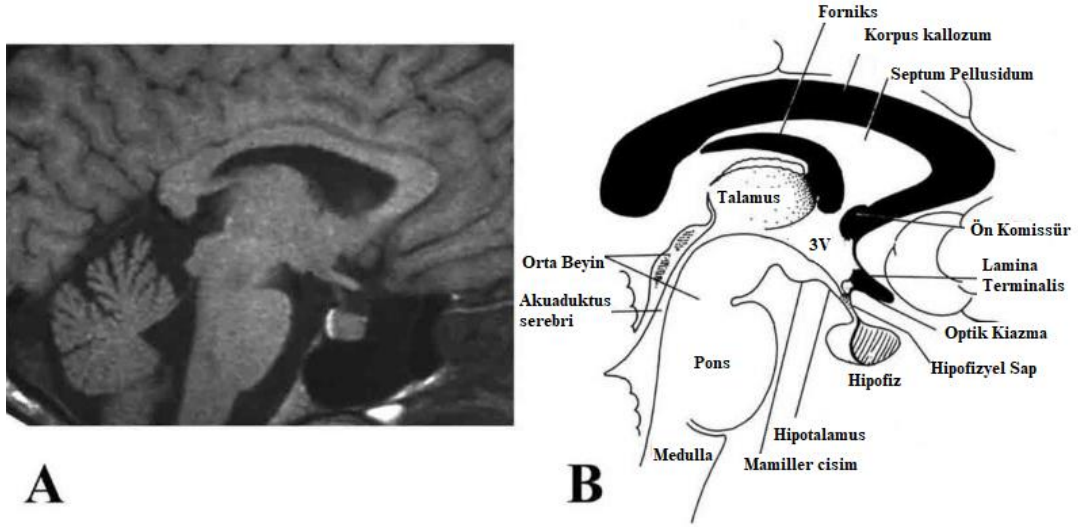
doluluk, bulantı veya şişkinlik gibi semptomları açığa çıkaran keyif ya da acı veren bir his olarak tanımlanır. Tokluk ise gıda alımının kesilmesinden sonra gelişen açlık hissinin oluşumuna kadar geçen süreyi yansıtır. Doyma yemek sonrası deneyimi yansıtırken, tokluk açlık periyodundan sonraki yeterli miktarda yenen besindeki sindirilmiş kilokalorileri yansıtır (Camilleri, 2015).

Visual, koku ve tat duyusu gibi uyarıcıların ekzokrin ve endokrin sekresyonları stimüle etmesiyle, daha gıdalar ağıza girmeden önce bağırsak hareketliliği uyarılmış olur. Yemeğin yutulmasıyla mekanoreseptörlerin uyarılması sağlanır. Gastrointestinal sistemden gelen sinyaller, duyu sinirleri ve dolaşım sistemi aracılığıyla beyne iletilir. Mekanoreseptörler (gastrik gerilme) ve kemoreseptörlerden (besin kompozisyonu, ozmolarite ve pH'daki değişiklikler) gelen afferent sinir sinyalleri, vagus siniri vasıtasıyla medulladaki dorsal vagal komplekse aktarılarak soliter traktus çekirdeğinin (NTS) medial ve dorsomedial kısımlarında son bulur. Beyin sapındaki parabransiyal çekirdekten ve NTS'den gelen uzantılar, hipotalamusu, lateral hipotalamik alanı, amigdalanın merkezi çekirdeğini ve stria terminalisin bed çekirdeğini innerve eder. NTS'den talamusa gelen uzantıların visseral duyu korteksi ile iletişim kurması halinde tokluk hissi algılanmış olur (Schwartz ve ark., 2000).

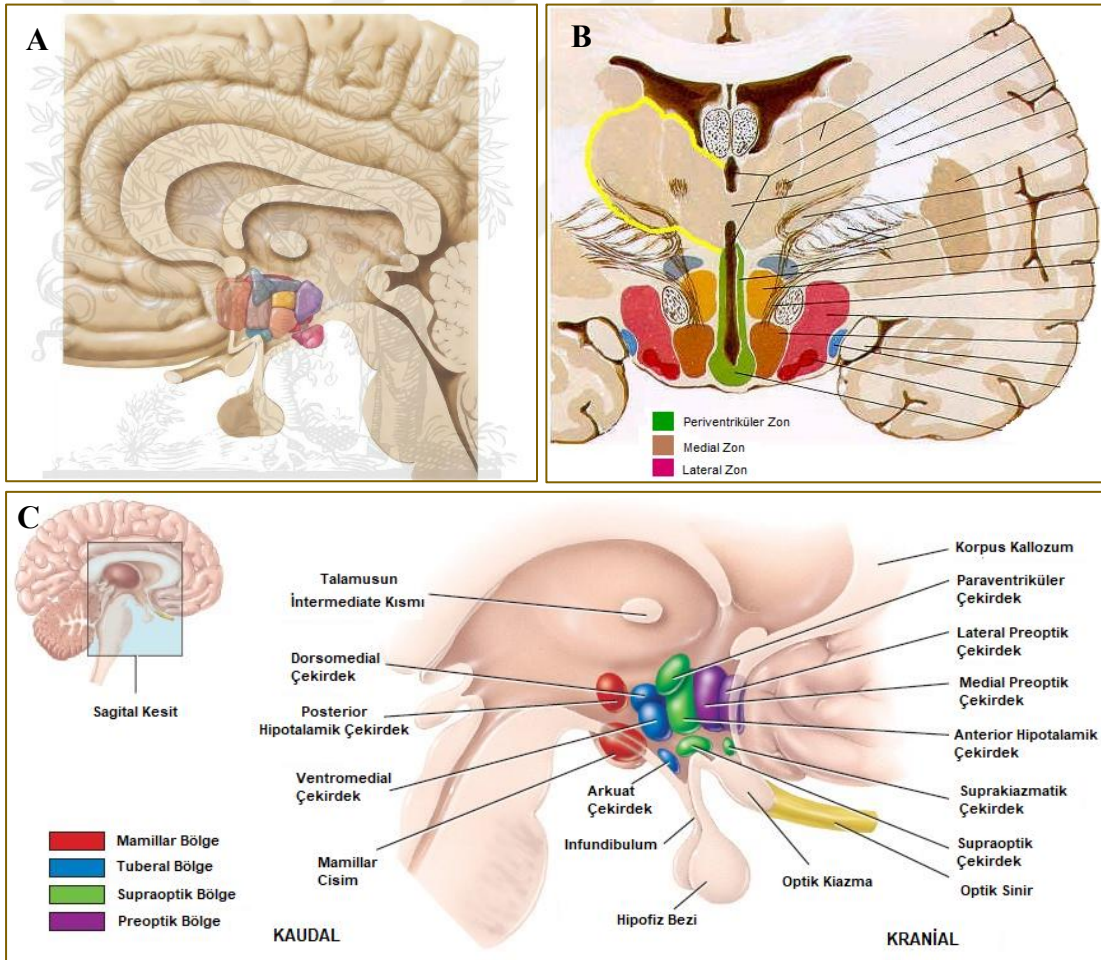
2.2. Besin Alımının Nöroendokrin Kontrolü

İştahın nöronal kontrolü, beyindeki hipotalamus ile beyin sapındaki soliter traktus çekirdeği tarafından gerçekleştirilir (Yosten, 2013). Hipotalamus; talamusun altında, hipofiz bezinin üzerinde, 3. ventrikül duvarını oluşturan, çok sayıda çekirdek içeren (nöron topluluğu) kompleks bir beyin bölgesidir (Berthoud, 2002). Sagittal kesitlerde, anterior sınırını anterior kommisür, lamina terminalis ve optik kiyazma, posterior sınırını interpedinküler fossa, superior sınırını hipotalamik oluk, inferior sınırını ise huni şeklinde infundibulumu yassılaştıran tüber sinereum kabartısı oluşturmaktadır (Lechan ve Toni, 2016) (Şekil 1).

Hipotalamus; fonksiyonel olarak medialden laterale doğru 3 farklı longitudinal zona (periventriküler, medial ve lateral) ayrılırken, rostra-kaudal seviyede ise 4 farklı bölgeye (preoptik, supraoptik veya anterior, tuberal ve mamiller bölge) ayrılmaktadır (Simerly, 2004) (Şekil 2).



Şekil 1. Hipotalamusun magnetik rezonans görüntüsü (A) ve anatomik lokalizasyonu (B), (Lechan ve Toni, 2016'dan modifiye edilmiştir).



Şekil 2. Hipotalamik zonlar ve bölgeler. Hipotalamusun genel topografisi (A), Medio-lateral doğrultudaki hipotalamik zonlar (B), Rostra-kaudal seviyedeki hipotalamik bölgeler (C). (A ve B şekilleri <https://www.netterimages.com>, C şekli <http://humanbrainfacts.org/hypothalamus.php> sitesindeki resimden modifiye edilmiştir (05.10.2017).

Hipotalamus, besin alımı ve enerji tüketimi arasındaki ilişkinin düzenlenmesi, kardiyovasküler fonksiyon, sıvı homeostazı, termoregülasyon, hipofiz bezi hormonlarının endokrin kontrolü, sirkadiyan ritim gibi birçok homeostatik mekanizmanın kontrolünü sağlayan 40'ın üzerinde farklı çekirdek içerir (Berthoud, 2002; Toni ve ark., 2004). Besin alımı ve enerji tüketiminde rol oynayan, birbirleriyle bağlantılı başlıca hipotalamik çekirdekler; arkuat çekirdek, paraventriküler çekirdek, periventriküler çekirdek (PeV), ventromedial çekirdek (VMN), dorsomedial çekirdek (DMN), lateral hipotalamik alan /perifornikal alan (PFA) ile beyin sapında yer alan soliter traktusun çekirdekleridir (Anubhuti, 2006; Yu ve Kim, 2012).

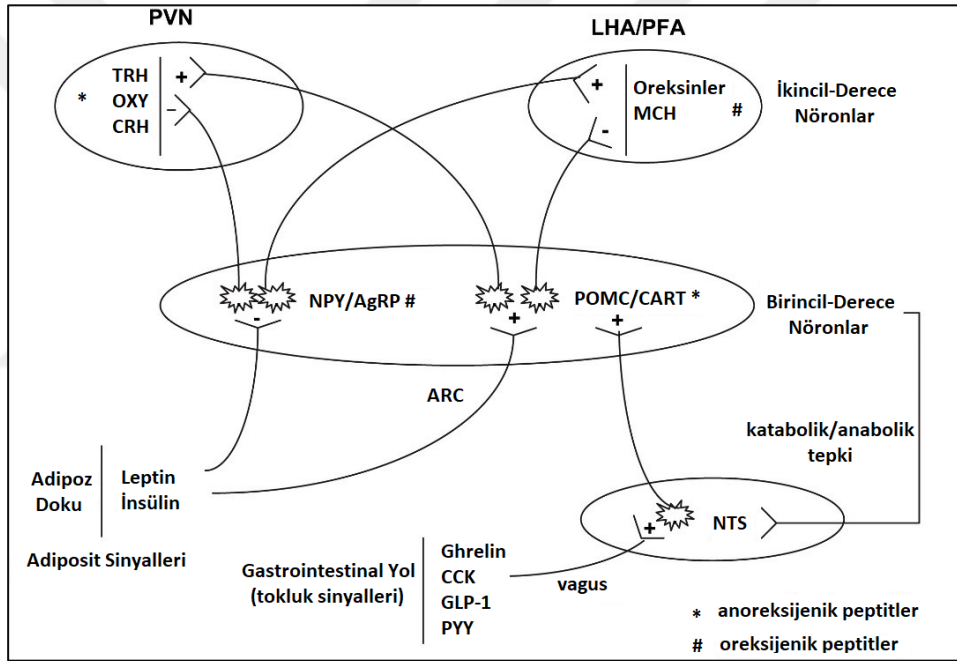
Besin alımı ve enerji dengesinin kontrolünü yapan açlık ve tokluk merkezlerinin hipotalamusta olduğu bilinmektedir. Hetherington ve Ranson (1940) tarafından yapılan klasik deneyler iştahı baskılayan (anoreksijenik) merkezin ventromedial hipotalamusta olduğunu gösterirken, Anand ve Brobeck (1951) tarafından yapılmış çalışmalar iştahı arttırıcı (oreksijenik) merkezin lateral hipotalamik alanda olduğunu göstermiştir.

Hipotalamusun arkuat çekirdeği, üçüncü ventrikül ile kan-beyin bariyerinin tam olmadığı median eminens arasında yerleşik (Cone ve ark., 2001), beslenme davranışının kontrolü ile ilişkili olarak tanımlanmış beyin bölgelerinden biridir (Sohn, 2015; Valassi ve ark., 2008). Ayrıca bu çekirdeğin median eminense yakın olması bu bölgenin periferden gelen zengin kan akımıyla desteklenmesini sağlamaktadır (Van den Top ve ark., 2004). Bundan dolayı da bu alanın hormonlara ve besleyici maddelere (leptin, insülin, gonadal steroidler ve glukoz gibi) karşı oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir (Cone ve ark., 2001).

Spesifik olarak, hipotalamusun arkuat çekirdeğinde lokalize beslenme davranışı üzerinde ters etkilere sahip iki farklı nöronal popülasyonun varlığı tanımlanmıştır (Sohn, 2015). Bunlardan ilki oreksijenik Nöropeptid Y (NPY) ve Agouti-İlişkili Peptit (AgRP) nöronları, ikincisi anoreksijenik pro-opiomelanokortin (POMC) ve kokain- ve amfetamin-düzenleyici transkript (CART) nöronlarıdır. Bu maddelerin salınımını yapan nöron grupları 'first order' (birincil derece) nöronlar olarak bilinir ve bu nöron grupları, paraventriküler çekirdek ile lateral hipotalamik alan ve perifornikal alanda lokalize olan 'second order' (ikinci derece) nöronlara aksonal uzantılarını gönderirler (Valassi ve ark., 2008), (Şekil 3).

Bu nöronları içeren nöronal ağın koordineli bir şekilde düzenlenmesi, enerji dengesinin düzgün bir şekilde devam ettirilmesinde gereklidir. Bu yolakta meydana gelen herhangi bir bozukluk hiperfaji/obezite ya da hipofaji/açlık ile sonuçlanabilmektedir (Sohn, 2015).

Leptin ve insülin gibi hormonlarla taşınan periferik sinyaller hipotalamik arkuat çekirdeğe ulaştığında katabolik yolağın aktifleşip, anoreksijenik peptitlerin (POMC/CART) salınımına (Valassi ve ark., 2008; Cowley ve ark., 2001) yol açarken tam tersi şekilde gastrointestinal yolla üretilen tokluk sinyali (ghrelin, kolesistokinin, peptit-YY gibi) anabolik yolağın aktivasyonuna neden olur bu da oreksijenik peptitlerin (NPY/AgRP) salınımına yol açar (Van den Pol ve ark., 2009), (Şekil 3).



Şekil 3. Yeme davranışının düzenlenmesinde yer alan ana yolların şematik gösterimi. ARC, arkuat çekirdek; NTS, soliter traktus çekirdeği; CCK, kolesistokinin; GLP-1, glukagon benzeri peptit-1; PYY, peptit YY; PVN, paraventriküler çekirdek; LHA, lateral hipotalamik alan; PFA, perifornikal alan; NPY, nöropeptit Y; AgRP, Agouti-ilişkili peptit; POMC, pro-opiomelanokortin; CART, kokain- ve amfetamin-düzenleyici transkript; CRH, kortikotropin-salğılatıcı hormon; TRH, tirotropin-salğılatıcı hormon; OXY, oksitosin; MCH, melanin-konsantr edici hormon. (Valassi ve ark., 2008'den modifiye edilmiştir)

Paraventriküler çekirdek, anterior hipotalamusta üçüncü ventrikülün superior kısmına bitişik, besin alımının kontrolünde rol oynayan, katabolik etkiye sahip nöropeptitleri sentezleyip salgılayan diğer bir çekirdektir. PVN, tirotropin-salğılatıcı hormon (TRH), kortikotropin-salğılatıcı hormon (CRH) ve oksitosin (OXY) sekresyonunun yapıldığı ana alandır (Şekil 3). Enerji dengesinde rol alan çoğu nöronal yolak PVN'de birleşir. Bu çekirdek özellikle oreksin, POMC türevli α -melanosit

uyarıcı hormon (α -MSH), galanin ve ARC'de yer alan NPY nöronlarından gelen ana uzantıları içerir ve beslenme sinyallerinin entegrasyonunda rol oynar. PVN'e oreksijenik ve anoreksijenik peptitlerin enjeksiyonu ile besin alımının değiştiği gösterilmiştir (Stanley ve ark., 2005).

Hipotalamusun ventromedial çekirdeği ise; 'tokluk merkezi' olarak tanımlanır. ARC, DMN, LHA ve beyin sapı bölgelerine aksonal uzantılarını gönderip başlıca ARC'deki NPY, AgRP ve α -MSH immünreaktif nöronların uzantılarını alır (Yu ve Kim 2012). VMN glukoz ve leptine duyarlı nöronları içerdiği için bu alanda meydana gelen herhangi bir lezyon hiperfaji ve obeziteye neden olur (Satoh ve ark., 1997). Beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF) bu çekirdekten eksprese edilir. Beslenme yetersizliği durumlarında BDNF içeren VMN nöronlarının melanokortin sistemi üzerinden enerji homeostazını düzenlediği bilinir (Xu ve ark., 2003).

Dorsomedial hipotalamik çekirdek, glukokortikoid salınımının modülasyonu, vücut ısısı, uyarılma, lokomotor aktivitenin sirkadiyen ritmi ve enerji dengesinin düzenlenmesi gibi çeşitli düzenleyici mekanizmalarda rol oynar (Chou ve ark., 2003). Lateral hipotalamik alan ve diğer medial hipotalamik çekirdekler ile bağlantılı olduğu, bu çekirdeklerden bilginin işlenmesini ve aktarımını sağladığı bildirilmiştir (Anubhuti, 2006; Elmquist ve ark., 1998). Ayrıca DMN'nin beslenmeyle ilgili merkezler olan ARC ve beyin sapından veri ('input') aldığı, bu çekirdekte oluşan lezyonların hipofaji ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Bellinger ve Bernardis, 2002).

Lateral hipotalamik alan ile perifornikal alan beyin sapından gelen sinyallerle ilişkili, hipotalamusun 'açlık merkezi' olarak bilinir. Bu alanda, POMC ve NPY nöronlarının uzantıları ile innerve olabilen oreksin veya MCH peptitlerini içeren nöronlar yer alır (Şekil 3). Hem oreksin hem de MCH nöronlarının uzantıları geniş bir alana yayıldığı için, enerji dengesinin düzenlenmesinin yanı sıra öğrenme, hafıza, duygu, motivasyon ve motor yanıtlarla ilişkili çeşitli davranış değişikliklerini de düzenlerler (Broberger ve ark., 1998; Gao ve Horvath, 2008). Bu alanlar hipoglisemi tarafından uyarılan glukozu duyarlı nöronları içerir ve normalde hipoglisemi ile indüklenen belirgin hiperfajiye aracılık etmek için önemlidir (Bernardis ve Bellinger, 1996).

Beyin sapında yer alan çekirdekler de iştahın kontrolünde rol oynarlar. Soliter traktus çekirdeği; POMC'yi eksprese eden nöronların iki majör popülasyonundan

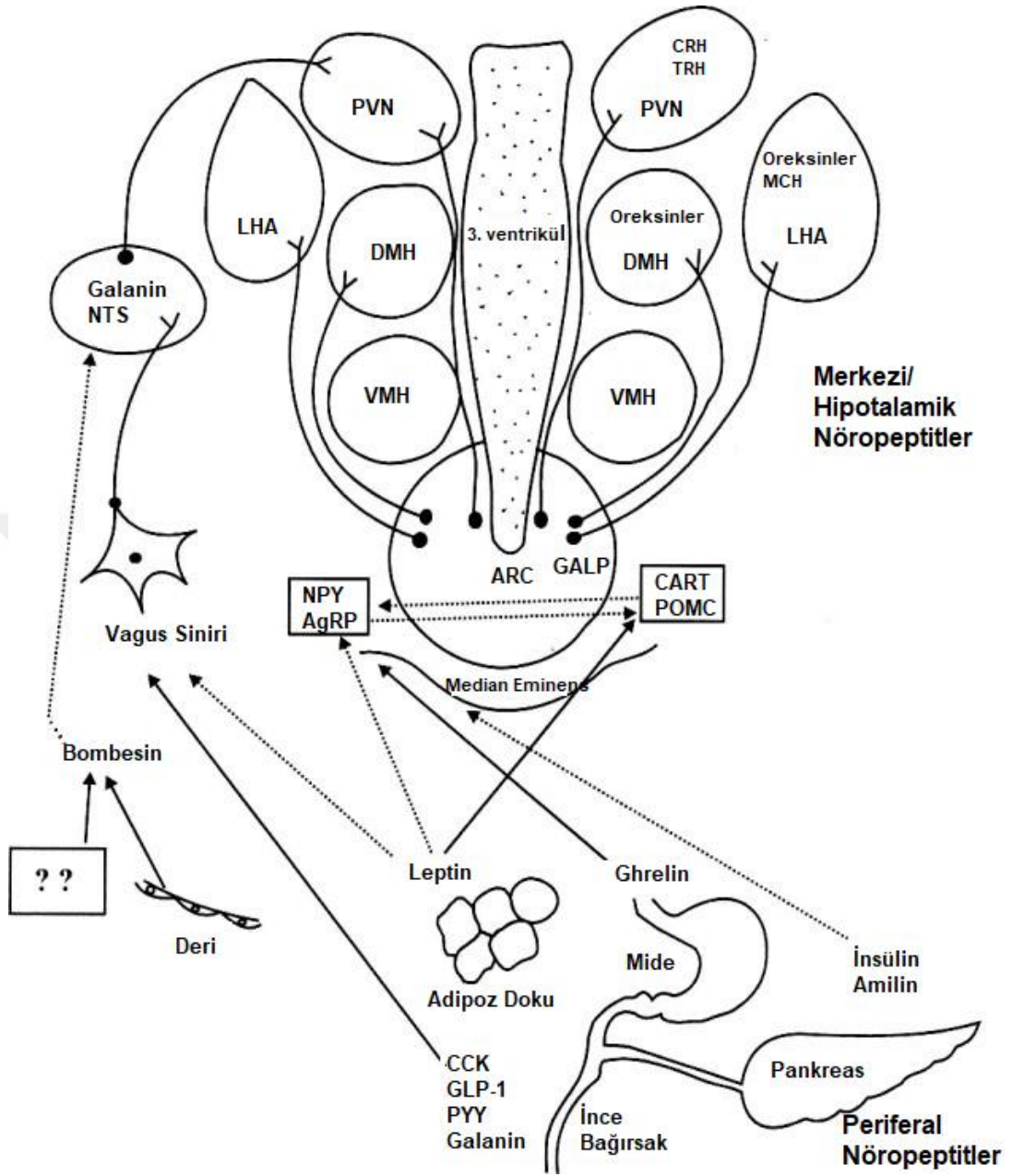
birini içerir ve melanokortin reseptör ekspresyonunun gerçekleştiği başlıca alan olarak bilinir (Berthoud, 2002). NTS, beslenme ile ilgili sinyalleri vagal afferentler aracılığıyla doğrudan alır. Hipotalamus ile doğrudan resiprokal bağlantılara sahiptir ve rostroventrolateral medulla ile olan bağlantılarıyla sempatik pregangliyonik nöronları modüle eder (Berthoud, 2002).

2.3. Besin Alımında Rol Oynayan Peptitler

Hipotalamus, çeşitli oreksijenik ve anoreksijenik nöropeptitlerin senteziyle kısa-sürelili ve uzun-sürelili beslenme alımının düzenlenmesine aracılık eder. Gıda alımını düzenleyen peptitler kökenlerine göre, merkezi sinir sisteminde üretilen merkezi peptitler ve sindirim kanalında üretilen periferik peptitler olarak sınıflandırılırken, beslenme davranışları üzerindeki etkilerine göre ise oreksijenik ve anoreksijenik peptitler olarak gruplandırılmaktadırlar. Oreksijenik peptitler açlık hissinin başlatılmasıyla gıda alımını uyarırlarken, anoreksijenikler doyma hissinin oluşturulmasıyla gıda alımını durduran peptitlerdir.

Tablo 1. Besin alımı ve enerji homeostazının regülasyonunda etkili olan majör nöropeptitler

NÖROPEPTİTLER	OREKSİJENİK AJANLAR	ANOREKSİJENİK AJANLAR
MERKEZİ	1) Nöropeptit Y (NPY)	1) Kokain ve Amfetamin-Düzenleyici Transkript
	2) Agouti-İlişkili Peptit (AgRP)	2) Melanokortinler
	3) Melanin-Konsantr Edici Hormon	3) Glukagon Benzeri Peptit
	4) Oreksinler	4) Kortikotropin-Saliverici Faktör (CRF)
	5) Galanin	5) İnsülin
	6) Endojen Opioidler	6) Serotonin
	7) Endokannabinoidler	7) Nörotensin
PERİFERAL	1) Ghrelin	8) Nöronostatin
		9) Nesfatin-1
		1) Peptid YY
		2) Kolesistokinin (CCK)
		3) Leptin
		4) Amilin
		5) İnsülin
6) Glukagon-Benzeri Peptitler		
7) Bombesin		



Şekil 4. Besin alımı ve enerji homeostazının regülasyonunda etkili olan nöropeptitler, hipotalamik çekirdekler ve ilişkili yollar. Diyagramın üst kısmı iştahın regülasyonunda yer alan hipotalamik çekirdeklerin lokalizasyonunu gösterirken, alt kısmı periferel organları ve salgıladıkları nöropeptitleri göstermektedir. Kesintisiz çizgiler stimülatör (uyarıcı) etkiyi, kesintili çizgiler hipotalamik çekirdekler/nöropeptitler üzerindeki periferel inhibitör (durdurucu) etkiyi göstermektedir. Çeşitli deneysel çalışmalar, hipotalamusun medial bölgesindeki lezyonların hiperfaji ile ilişkili olduğunu gösterirken hipotalamusun lateral kısmındaki lezyonların ise iştah kaybına yol açtığını göstermiştir. Kısaltmalar: PVN, Paraventriküler çekirdek; LHA, Lateral hipotalamik alan; DMH, Dorsomedial hipotalamus; VMH, Ventromedial hipotalamus; ARC, Arkuat çekirdek; NTS, Soliter traktus çekirdeği; ??, Bombesin nöropeptidinin bilinmeyen kaynağı (Anubhuti, 2006'dan modifiye edilmiştir).

2.3.1. Hipotalamustan Salgılanan Oreksijenik Nöropeptitler

Nöropeptid Y (NPY):

Nöropeptit Y, iştahı artıran en güçlü merkezi sinyallerden biri olarak kabul edilir. Birincil ekspresyon yeri hipotalamik arkuat çekirdek olmakla beraber, NPY nöronları uzantılarını PVN, LHA, DMH, PFA ve VMN ve diğer beyin bölgelerine gönderirler (Ramos ve ark., 2005). NPY nöronlarının %90'ı AgRP'yi ko-eksprese eder (Schwartz ve ark., 2000). NPY'nin davranış ve diğer fonksiyonlar üzerine direkt etkilerinin olduğu bilinmesine karşın en önemli etkisinin beslenmeyi uyarıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Wisialowski ve ark., 2000). NPY'nin arkuat çekirdekteki sentezi, hem de PVN'e salınımı (uzantılarını göndermesi) inhibitör afferent sinyaller (leptin ve insülin gibi) ile stimülatör sinyaller (glukokortikoidler) tarafından düzenlenmektedir (Marsh ve ark., 1998; Pedrazzini ve ark., 1998).

Melanin-Konsantre Edici Hormon (MCH):

Melanin-konsantre edici hormon, lateral hipotalamus ile zona inserta da eksprese edilen oreksijenik etkilere sahip bir nöropeptittir (Bittencourt ve ark., 1992). Bu etkisini, nükleus akkumbens de bulunan MCHR1 reseptörleri üzerinden gerçekleştirir (Sears ve ark., 2010). Lateral hipotalamik alandaki MCH nöronları, sadece beslenmeyle ilgili olan hipotalamik alanlara uzantılarını göndermezler aynı zamanda uyku/uyanıklık ve uyarılmanın kontrolü ile ilişkili beyin bölgelerine de uzantılarını gönderirler (Guyon ve ark., 2009; Williams ve ark., 2001).

MCH'in merkezi enjeksiyonu sonrasında sıçanlarda vücut ağırlığında artış ile belirgin bir hiperfaji görülmüştür (Qu ve ark., 1996). Ayrıca leptin eksikliği olan ob/ob farelerde, MCH mRNA seviyelerinin arttığı leptin uygulaması sonrasında da MCH ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Williams ve ark., 2004).

Agouti-İlişkili Protein (AgRP):

AgRP, sadece hipotalamik arkuat çekirdekte eksprese edilen (Broberger ve ark., 1998), besin alımını kontrol eden hipotalamik çekirdeklere (PVN, LHA, DMN) uzantılarını gönderen oreksijenik bir peptittir (Hagan ve ark., 2000). Bahsi geçen hipotalamik çekirdeklere, NPY mRNA'sı ile AgRP mRNA'sının ko-lokalizasyonu

gösterilmiştir (Broberger ve ark., 1998; Hahn ve ark., 1998). AgRP'nin PVN'e veya DMN'ye intraserebroventriküler (Rossi ve ark., 1998) ya da direkt olarak verilmesi (Kim ve ark., 2000) besin alımında inhibe edici etkisinin olduğunu göstermektedir.

AgRP ayrıca melanokortin-3 ve melanokortin-4 reseptörünün endojen antagonisti olarak görev yapar (Ollmann ve ark., 1997). NPY/AgRP nöronlarından gelen inhibitör GABAerjik sinyaller, merkezi sinir sistemindeki anoreksijenik nöronları etkileyerek besin alımını arttırmaktadır (Cowley ve ark., 2001; Sohn, 2015).

Oreksinler:

Oreksinler (hipokretin) açlık durumlarında artan ve besin alımı yollarını tetikleyen, oreksin A ve oreksin B peptitleri olarak, ilk kez 1998 yılında tanımlanmıştır. Hipotalamusta yerleşik nöronlar tarafından sentezlenen oreksinlerin hem hipotalamus içerisinde hem de hipofiz üzerinde nöroendokrin etkilerini gösterdikleri bildirilmiştir (Shirasaka ve ark., 2002). Oreksinerjik nöronların büyük çoğunluğunun lateral hipotalamus/perifornikal alanda yerleşik olduğu gösterilmiştir. Yiyecek kısıtlamasıyla oluşan hipoglisemide oreksin nöronlarının aktive olması (c-Fos ekspresyonu pozitif) bu nöronların besin alımı üzerine etkilerini teyit etmiştir (Ferguson ve Samson, 2003). Oreksinin intraserebroventriküler (icv) uygulanmasının deneklerde besin alımını arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Lubkin ve Stricker-Krongrad, 1998; Sakurai ve ark., 1998). Enerji dengesinin düzenlenmesinde oreksin nöronları nöropeptit-Y ve α -melanin stimüle edici hormon nöronlarıyla entegre olarak etki gösterirler (Horvath ve ark., 2009).

Oreksin nöronlarının çeşitli alanlara aksonal uzantı gönderdiği ve bu alanların başında hipotalamusun arkuat çekirdeği (Funahashi ve ark., 2003) ile locus coeruleusun yer aldığı bildirilmiştir (Marcus ve Elmquist, 2006). Ayrıca glutamat agonistlerinin oreksin nöronlarını aktive ettikleri (Eyigor ve ark., 2010) ve oreksin nöronlarında glutamat reseptörlerinin sentezlendiği belirlenmiştir (Eyigor ve ark., 2012).

2.3.2. Hipotalamustan Salgılanan Anoreksijenik Peptitler

Kokain ve Amfetamin-Düzenleyici Transkript (CART):

CART, enerji homeostazisinin ve iştahın düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir nörotransmitter ve hormondur (Lau ve Herzog, 2014). CART nöronlarının %90'ı, arkuat çekirdekdeki POMC nöronlarıyla birlikte lokalize olurlar. Adiposit sinyaliyle (leptin ya da insülin) aktive olan CART nöronları uzantılarını 'second order' nöronlara gönderirler (Aja ve ark., 2001), (Şekil 3).

CART peptidinin ekspresyonu beynin çeşitli bölgelerinde özellikle hipotalamik çekirdekler (PeV, DMN, ARC, LHA ve PFA) ile nucleus accumbens de belirlenmiştir (Lau ve Herzog, 2014). Paraventriküler çekirdekte bulunan CART m-RNA'sının vazopressin ve CRF-içeren nöronlarla (Li ve ark., 2002), arkuat çekirdekdeki CART'ın α -MSH ile (Adam ve ark., 2002) kolokalize olduğu bildirilmiştir. Kemirgenlerde nucleus accumbense CART'ın enjeksiyonu besin alımını inhibe etmiştir (Jean ve ark., 2007; Yang ve ark., 2005).

Melanokortinler:

Melanokortinler, POMC prekürsör molekülünden türeyen bioaktif peptitlerdir (Anubhuti, 2006). Hipotalamik nöronlarda eksprese edilen bu peptitlerin (adrenokortikotropin ve α -, β -, γ -melanosit-uyarıcı hormonlar) çeşitli fizyolojik rolleri tanımlanmıştır. Enerji homeostazisinde ve iştahın kontrolünde rol oynayan melanokortin-4 reseptörü (MC4R) için endojen bir agonist olarak görev yaparlar (Neary ve ark., 2004). α -MSH'in merkezi olarak verilmesi, beslenmeyi inhibe ederek vücut ağırlığının azalmasına neden olur. Melanokortin-3 reseptörü (MC3R) ve MC4R'nin endojen antagonisti olan AgRP'nin stimülatör etkisi α -MSH sinyalini inhibe ederek besin alımını uyarır (Rossi ve ark., 1998).

Glukagon-Benzeri Peptitler:

Glukagon'un öncülü olan pre-proglukagon, pankreastaki α -hücrelerinden, bağırsaktaki L-hücrelerinden ve soliter traktusun kaudal çekirdeğinin nöronlarından sınırlı miktarlarda eksprese edilmektedir. Pankreastaki proglukagonun birtakım post-translasyonel işlemler sonucunda yıkılması sonucu glukagon ve proglukagon

fragmanları [glisentin, oksintomodülin (OXM), glukagon-benzeri peptit-1 (GLP-1) ve glukagon-benzeri peptit-2 (GLP-2)] oluşmaktadır (Vrang ve ark., 2003).

GLP-1 ve GLP-2; yemeklerden sonra dolaşıma salınan peptitler olmasına karşın NTS'nin kaudal parçasındaki nöronlarda nörotransmitter olarak da görev yapar. GLP-1 içeren sinir lifleri ile GLP-1 reseptörleri, yiyecek ve su alımının regülasyonunda yer alan çoğu hipotalamik çekirdekte yer almaktadır (Merchenthaler ve ark., 1999). Erkeklerde GLP-1'nin intravenöz enjeksiyonu, gastrik boşalma, açlık ve besin alımı üzerinde engelleyici etkilere sahiptir (Schmidt ve ark., 2003). Ayrıca sıçanlarda GLP-1 (Tang-Christensen ve ark., 1996) ve GLP-2'nin (Tang-Christensen ve ark., 2000) intraserebroventriküler enjeksiyonlarının besin alımını baskıladığı gösterilmiştir.

Kortikotropin Salıverici Faktör (CRF):

Kortikotropin salıverici faktör (CRF), hipofizden salınan adrenokortikotropik hormonun (ACTH) fizyolojik düzenleyicisi olarak bilinen bir nörohormondur (Vale ve ark., 1981). Hipotalamik PVN'de eksprese edildiği bilinen CRF (Crespo ve ark., 2014), hem termojenik hem de endojen kaynaklı anorektik bir ajandır (Richard, 1999). CRF'nin beyine özellikle de hipotalamusun paraventricüler çekirdeğine enjekte edilmesi, spontan beslemeyi veya açlıkla uyarılmış beslemeyi azaltmaktadır (Heinrichs ve ark., 1998; Levine ve Billington, 1989; Morley, 1987). Ayrıca CRF'nin kronik kullanımı, anoreksi ile progresif kilo kaybına neden olmaktadır (Schwartz ve ark., 1995).

Nöronostatin

Nöronostatin peptiti, ilk kez 2008 yılında tanımlanmış nöronostatinin intraserebral enjeksiyonunun besin alımını inhibe ettiği saptanmıştır (Samson ve ark., 2008). Hipotalamusta nöronostatin nöronlarının lokalize olduğu alanlar besin alımının kontrolünde rol oynayan bölgelerdir. İmmunohistokimyasal çalışmalar, nöronostatin-pozitif nöronların hipotalamik periventricüler ve suprakiazmatik nukleusta, nöronostatin-pozitif aksonların ise median eminens ile arkuat nukleusta yoğunlaştığını göstermiştir. Ayrıca, motor korteks, amigdala, beyincik ve dentat girusun polimorfik tabakasında da daha az sayıda ve daha az yoğunlukta işaretlenmiş nöronostatin-pozitif

hücrelerin varlığı belirlenmiştir (Dun ve ark., 2010). İntraventriküler nöronostatin uygulamasını takiben su ve besin alımını azalttığına gösterilmesi (Carlini ve ark., 2011; Samson ve ark., 2008), nöronostatinin iştah ve metabolizmanın kontrolünde görev alabileceğini araştırmacılara düşündürmektedir.

2.4. Nesfatin-1

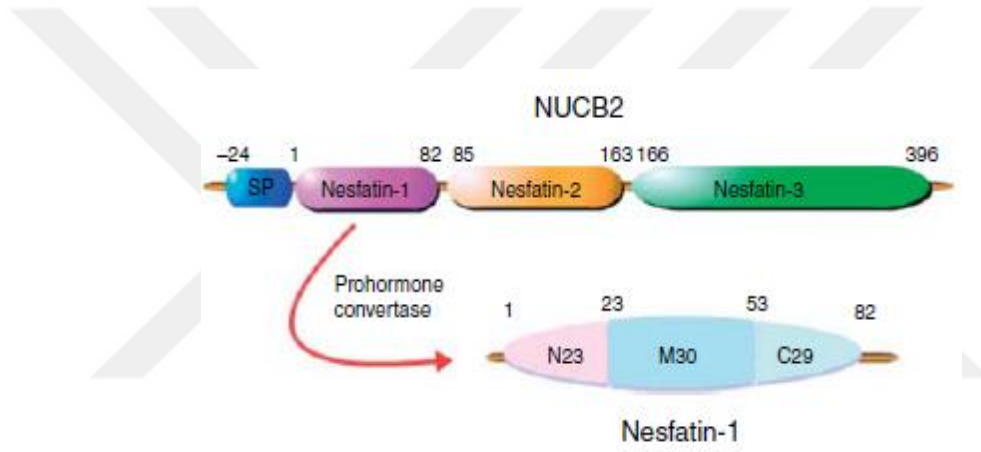
Nesfatin-1 ilk kez Oh-I ve arkadaşları (2006) tarafından keşfedilmiş, 82 amino asite sahip, endojen bir protein olarak tanımlanmış, homeostatik beslenmenin kontrolünde rol oynayan anoreksijenik bir peptittir. Etkileri dolayısıyla “tokluk molekülü” olarak da adlandırılan nesfatin-1, ilk defa hipotalamus ve soliter traktusta yerleşik nöronlarda belirlenmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Nesfatin-1’in periferik ya da merkezi yolla deneklere uygulandığında besin alımının baskılandığı (Palasz ve ark., 2012; Shimizu ve ark., 2009a; Stengel ve Tache, 2010; Stengel ve ark., 2010) ve dolayısıyla vücut ağırlık kaybına yol açtığına gösterilmesiyle birlikte, bu peptitin iştahı kontrol eden yolaktaki önemi ortaya çıkmıştır. Leptin geni susturulmuş (knockdown fareler) obez farelerde bile besin alımının nesfatin-1 peptiti tarafından baskılandığının ortaya çıkarılması bu peptitin hem leptin yolağından bağımsız bir şekilde çalıştığını hem de leptin geninde mutasyon olan obez bireylerin tedavi sürecinde araştırılması gereken bir molekül olduğunu araştırmacılara göstermektedir.

2.4.1. Nesfatin-1 Geninin Keşfi ve Moleküler Yapısı

Nesfatin-1’in keşfi, adipositler ile medulloblastoma hücrelerinde eksprese edilen bir gen’in tanımlanması ile başlamıştır. Bu gen, peroksizom-proliferatörü ile aktive olan reseptör geninin (PPAR) γ stimüle edilmesiyle aktive edilen troglitazone’un ligandı olarak rol oynamaktadır (Stengel, 2015). 1990’ların başında keşfedilen bu gen nükleobindin (NUCB) veya NEFA (DNA bağlayıcı /EF-hand/ asidik aminoasit açısından zengin bölge) olarak adlandırılmıştır (Barnikol-Watanabe ve ark., 1994). Şimdiye kadar nükleobindin1 (NUCB1) ve nükleobindin2 (NUCB2) olmak üzere 2 tane nükleobindin geni tanımlanmıştır (Crespo ve ark., 2014).

Rekombinant NUCB2 proteininin beyine enjekte edildiğinde, besin alımını azalttığı ve de vücut ağırlığının kontrolünde yer alan hipotalamik çekirdeklerde eksprese edildiğinin gösterilmesinin ardından bu faktör nesfatin (NEFA/NUCB2 ile

kodlanmış tokluk ve yağ-etkili protein) olarak isimlendirilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). NUCB2/Nesfatin, 396 aminoasit (aa) içeren polipeptit bir yapı ile 24 amino asitin oluşturduğu N-terminal sinyal peptidinden meydana gelir (Shimizu ve ark., 2009b), (Şekil 5). NUCB2'nin plazma membranı ile sitoplazmada lokalize olduğu bildirilmiştir (Miura ve ark., 1992). Yapısal analizler sonucunda sıçanlardaki NUCB2/Nesfatin dizilerinin (sekans) prohormon konvertaz (PC)-1/3 enzimleriyle post-translasyonel bir şekilde bölünmesi sağlanarak nesfatin-1 (1-82 aa), nesfatin-2 (85-163) ve nesfatin-3 (166-396 aa) aktif prekürsörleri tanımlanmıştır (Oh-I ve ark., 2006). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda sadece nesfatin-1 ve onun fragmenti nesfatin-1₂₄₋₅₃'ün biyolojik aktivitesi ortaya konabilmiştir (Aydin, 2013).



Şekil 5. NUCB2 proteini ve nesfatin-1'in yapısı. SP, sinyal peptidi (Garcia-Galiono ve ark., 2010a).

NUCB2'nin sinyal peptidinin (SP) hemen ardında yer alan nesfatin-1 (1-82 aa), N-terminal (N23), merkezi parça (M30) ve C-terminal (C29) olmak üzere 3 alt domainden oluşmaktadır. M30 orta parçası, bu peptidin fizyolojik rollerde özellikle de anoreksijenik cevaplarda etkin bir şekilde rol almasını sağlayan aktif kısmını oluşturur. NUCB2'den türeyen diğer fragmentler olan nesfatin-2 (85-163 aa) ve nesfatin-3 (166-396 aa) ise tokluk hissini uyarmayan uzun sekanslı inaktif formlardır (Şekil 1) (Oh-I ve ark., 2006; Palasz ve ark., 2012). NUCB2/Nesfatin'in amino asit sekansı insanlarda, farelerde ve sıçanlarda korunurken tüm bu türler arasında %85'in üstünde benzer homoloji gözlenmiştir.

2.4.2. Nesfatin-1'in Sinyal İletimi

NUCB2/nesfatin-1 reseptörü henüz belirlenememiş olmasına rağmen nesfatin-1'in spesifik bağlanma alanları hem merkezi sinir sisteminde (hipotalamus, hipofiz ve beyin korteksi) hem de periferel organlarda (gastrointestinal sistem, pankreas gibi) saptanmıştır (Ishida ve ark., 2012, Prinz ve ark., 2016).

Nesfatin-1'in hedef hücrelerin nöroplazmasındaki Ca^{2+} iyon konsantrasyonunu arttırdığına dair pek çok veri bulunmaktadır (Palasz ve ark., 2012). Çoğu hücre tipinde (hipotalamik çekirdekler, dorsak kök gangliyonu (DRG) nöronları, pankreatik β -hücreleri ve kardiak miyositler gibi) (Riccardo ve ark., 2017) nesfatin-1'in hücre içi sinyal iletimini, L- (Nakata ve ark., 2011), P/Q- (Brailoiu ve ark., 2007; Brailoiu ve ark., 2013) veya N- (Iwasaki ve ark., 2009) tipi Ca^{2+} kanalları vasıtasıyla Ca^{2+} akımını uyatarak yaptığı bildirilmiştir. Gi-protein-bağlı reseptörün nesfatin-1 ile uyarılması, Ca^{2+} kanallarının açılmasına ve/veya hipotalamik nöronlarda protein kinaz A ve adenilat siklaz yolağının aktive edilmesine yol açar. Nesfatin-1'in metabotropik reseptörler üzerinden ligand olarak rol oynamasıyla sinyal iletimi gerçekleştirilmiş olur (Brailoiu ve ark., 2007; Palasz ve ark., 2012).

2.4.3. NUCB2/Nesfatin-1'in Ekspresyonu

2.4.3.1. Nesfatin-1'in Hücresel Düzeyde Ekspresyonu

Nesfatin-1'in lokalizasyonuna hücresel düzeyde bakıldığında, hipotalamik PVN'deki nesfatin-1-pozitif nöronların Golgi aparatı yanındaki salgılayıcı veziküllerde yer aldığı, akson terminallerinde bulunmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca nesfatin-1'in nöronal dentritlerden salındığı dolayısıyla da otokrin ve parakrin olayların sonucunda bu alanda lokalize olduğu bildirilmiştir (Maejima ve ark., 2009).

2.4.3.2. Nesfatin-1'in Merkezi Ekspresyonu

Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen ilk immünohistokimyasal çalışmalar NUCB2 mRNA'sı ve proteininin beslenmenin merkezi düzenlenmesinde rol alan hipotalamik çekirdeklerden arkuat çekirdek, paraventriküler çekirdek, supraoptik çekirdek ve lateral hipotalamik alanda bulunduğunu göstermiştir (Oh-I ve ark., 2006).

Sıçan, fare ve domuzlar üzerinde yapılan sonraki çalışmalar diğer beyin bölgeleri ile hipotalamik çekirdeklerde [insular korteks, merkezi amigdaloïd çekirdek, periventriküler çekirdek, tuberal hipotalamik alan, dorsomedial hipotalamik çekirdek, Edinger-Westphal çekirdeği (EW), medullar raphe çekirdeği, kaudal raphe çekirdeği, ventrolateral medulla, lokus koeruleus, serebellum, vagusun dorsal motor çekirdeği, soliter traktus ve medulla spinalis'in pregangliyonik sempatik ve parasempatik nöron gruplarında] NUCB2/Nesfatin-1 lokalizasyonunu göstermiştir (Brailoiu ve ark.; 2007; Foo ve ark., 2008; Fort ve ark., 2008; Goebel ve ark., 2009a; Inhoff ve ark., 2008; Inhoff ve ark., 2010; Kohno ve ark., 2008). Bu lokalizasyon sonuçları, NUCB2/Nesfatin-1 mRNA'sı ve immünoreaktivitesini araştıran çoğu araştırmacı tarafından doğrulanmıştır (Brailoiu ve ark., 2007; Foo ve ark., 2008; Goebel ve ark., 2009b; Goebel-Stengel ve ark., 2011; Kohno ve ark., 2008).

NUCB2/Nesfatin-1'in beyindeki bu yaygın dağılımı, nesfatin-1'in besin alımı üzerindeki etkisinin de ötesinde olan fonksiyonlarda (otonomik işlevler ve strese yanıtta rol) yer aldığını düşündürmektedir (Stengel, 2015). Ayrıca farelerde NUCB2/Nesfatin-1 immünreaktivitesinin hipotalamusun intermediate dorsomedial alanında belirgin bir şekilde gösterilmesi yeni hipotalamik çekirdeklerin tanımlanması açısından önemlidir (Goebel-Stengel ve ark., 2011).

İkili immünohistokimya yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda NUCB2/Nesfatin-1'in lokalizasyonunun yanısıra bu peptiti eksprese eden nöronların fenotipi de araştırılmıştır (Stengel, 2015). Nesfatin-1'i içeren nöronlar, açlık ve tokluğun regülasyonunda yer alan diğer nöropeptitlerle ko-lokalize olarak bulunabilirler.

NUCB2/Nesfatin-1; ürokortin-1 (~%90), melanin-konsantre edici hormon (MCH, ~%80), kokain ve amfetamin-düzenleyici transkript (CART, ~%70), α -melanosit-uyarıcı hormon (α -MSH, ~%60), pro-opiomelanokortin (POMC, ~%60-80), vazopressin (~%50), nöropeptit Y (NPY, ~%40), oksitosin (~%40), büyüme hormonunu-salgılayıcı hormon (GHRH, ~%30), kortikotropin-salıverici faktör (CRF, ~%20), tirotropin salgılatıcı hormon (TRH, ~%20), somatostatin (~%10), nörotensin (~%10) ve serotonin nöropeptitleriyle ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (Brailoiu ve ark., 2007; Foo ve ark., 2008; Fort ve ark., 2008; Inhoff ve ark., 2010; Kohno ve ark., 2008; Maejima ve ark., 2009; Okere ve ark., 2010).

2.4.3.3. Nesfatin-1'in Periferik Dokulardaki Ekspresyonu

NUCB2/Nesfatin-1'in beyindeki lokalizasyonunun yanı sıra, çoğu periferik dokudaki ekspresyonu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Sıçanların ve kırmızı balıkların (goldfish) ön hipofiz bezi, yağ dokusu, kalp, pankreas, mide ve testis dokularında nesfatin-1 peptidinin ekspresyonları gösterilmiştir (Feijoo-Bandin ve ark., 2013; Foo ve ark., 2010; Gonzalez ve ark., 2009; Gonzalez ve ark., 2010; Ramanjaneya ve ark., 2010; Stengel ve ark., 2009a).

Ayrıca midedeki NUCB2 mRNA ekspresyon düzeyinin, sıçan beyindeki ekspresyon düzeyinde 10 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Midedeki NUCB2/Nesfatin-1'i eksprese eden hücrelerin hem gastrik endokrin hücrelerdeki dominant varlığı hem de gastrik X-A benzeri hücrelerdeki varlığı gösterilmiştir (Stengel ve ark., 2009b).

Pankreasta ise NUCB2/Nesfatin-1'in Langerhans adacıklarının β -hücrelerinde insülin ile ko-lokalize olduğu bildirilmiştir (Foo ve ark., 2010). NUCB2/Nesfatin-1 peptidinin yaygın periferik dağılımı, aslında homeostatik yolda yer alan çoğu peptid ile olan ilişkisini ortaya koymaktadır.

2.4.4. Besin Alımında Nesfatin-1'in Etkileri

2.4.4.1. Merkezi Etkileri

Wistar cinsi erkek sıçanlarda yapılan doz bağımlı çalışmalarda, bu molekülün üçüncü beyin ventrikülüne intraserebroventriküler enjeksiyonu sonrasında deneklerin yiyecek alımının ve vücut ağırlığının azaldığı gösterilmiştir (Oh-I ve ark., 2006). Bu sonuç, birbirinden bağımsız olarak çalışan çoğu araştırmacı tarafından doğrulanmıştır. Fareler (Atsuchi ve ark., 2010; Goebel ve ark., 2011), sıçanlar (Chen ve ark., 2012; Dong ve ark., 2014; Moreau ve Ciriello, 2013) ve kırmızı balık (goldfish) (Kerbel ve Unniappan, 2012) üzerinde yapılan çoğu çalışmada nesfatin-1'in lateral, üçüncü, dördüncü beyin ventriküllerine, sisterna magna'ya, hipotalamik çekirdeklerden PVN, LHA ve de dorsal vagal komplekse (DVC) yapılan düşük dozdaki (5-20 pmol) icv enjeksiyonlarının sonucunda nesfatin-1'in anoreksijenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Stengel, 2015; Stengel ve Tache, 2013).

Bu bulguların ardından gelen araştırmalar nesfatin-1'in anoreksijenik etkilerinin kinetiğini karakterize etmeye çalışmıştır. Sıçanlarda lateral beyin ventrikülüne yapılan düşük dozdaki (5 pmol) enjeksiyonun sonucunda nesfatin-1'in karanlık evrede ve uzun süreli (6-48 saat süren) şekilde besin alımını azalttığı gösterilmiştir (Konczol ve ark., 2012; Stengel ve ark., 2009a; Stengel ve Tache, 2013). Sıçanlara yüksek dozdaki (25-80 pmol) nesfatin-1'in icv enjeksiyonu sonrası anoreksijenik etki yanında anksiyete benzeri davranışların da arttığı gözlenmiştir (Merali ve ark., 2008). İlginç bir şekilde, üçüncü, dördüncü beyin ventrikülleri ya da sisterna magna'ya yapılan enjeksiyonlarda, nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinin post-enjeksiyonun ilk birinci saatinde ortaya çıktığı, arka beyin bölgelerine karşılık ön beyin bölgelerinde bu etkinin farklı düzeylerde olduğu gözlenmiştir (Oh-I ve ark., 2006; Stengel ve ark., 2009a).

Beyin parankimasına mikroenjeksiyon kullanılarak yapılan sonraki çalışmalarda nesfatin-1'e duyarlı hipotalamik beyin bölgeleri araştırılmıştır. Nesfatin-1'in direk olarak PVN'e ya da yüksek dozlarda LHA'a mikroenjeksiyonları karanlık evredeki besin alımını azaltırken, VMH'a olan mikroenjeksiyonları sonucunda herhangi bir etki gözlenmemiştir (Chen ve ark., 2012). Bu sonuç, PVN'in nesfatin-1'in anoreksijenik etkisinde yer alan primer hipotalamik alan olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Wistar cinsi erkek sıçanlar kullanılarak yapılan başka bir çalışmada, endojen beyin NUCB2/Nesfatin-1 sinyalinin üçüncü beyin ventrikülü içine yapılan anti-nesfatin-1 antikoru ya da anti-NUCB2 antisense oligonükleotitinin enjeksiyonu ile bloke edilmesi sonucunda, hayvanlarda beslenmenin ve kilo alımının arttığı gösterilmiştir (Maejima ve ark., 2009). SON ve PVN'deki NUCB2 mRNA'sı ve protein ekspresyonunun açlık durumlarında azaldığı, tekrar beslenmenin sağlanmasıyla nesfatin-1 seviyelerinin normal durumuna geldiği belirlenmiştir (Garcia-Galiano ve ark., 2010b; Kohno ve ark., 2008). Ayrıca paraventriküler çekirdekteki NUCB2 mRNA düzeyleri, besin alımının minimum olduğu aydınlık evrede artarken besin alımlarının oldukça yüksek olduğu karanlık evre boyunca azalmıştır (Sedbazar ve ark., 2013).

2.4.4.2. Periferal Etkileri

Nesfatin-1'in besin alımını kontrol eden yolaktaki santral etkilerinin yanında periferik etkileri de son zamanlarda yoğun araştırma konusu olmuştur. Bu peptidin kemirgenlerin (Mohan ve Unniappen, 2012) ve insanların (Zhang ve ark., 2012) plazmalarındaki varlığı gösterilmiş olmasına rağmen dolaşımdaki kaynağının ne olduğu hala bilinmemektedir. Plazmadaki nesfatin-1'in olası kaynakları olarak subkütanöz yağ dokusu, gastrik mukozanın endokrin hücreleri ve bağırsaklar, endokrin pankreas, özellikle de pankreatik β -hücreleri gösterilmektedir (Ramanjaneya ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2010; Gonzalez ve ark., 2009).

Açlıkta NUCB2/nesfatin-1'in dolaşımdaki miktarının giderek azaldığı, tekrar beslenmenin sağlanmasıyla nesfatin-1 seviyesinin normale döndüğü bildirilmiştir (Stengel ve ark., 2009). Benzer şekilde sıçanlara nesfatin-1'in devamlı bir şekilde periferik infüzyonu, kümülatif besin alımını azaltmıştır (Gonzalez ve ark., 2011).

Farelere intraperitoneal (ip) olarak verilen yüksek dozdaki nesfatin-1'in karanlık evredeki besin alımını azaltarak beslenmeyi etkilediği düşünülmektedir (Shimizu ve ark., 2009b). Yüksek yağ içerikli diyetle beslenmiş obez farelerde veya leptin reseptör geninde mutasyon içeren db/db farelerde, beslenmeyi engelleyici etkinin devam ettiği gösterilerek bu etkinin leptin sinyalinden bağımsız bir şekilde olduğu bildirilmiştir. (Oh-I ve ark., 2006; Shimizu ve ark., 2009b). Yapısal olarak birbirinden farklı olan nesfatin-1 fragmanları (N-terminal, C-terminal ya da orta parça) kullanılarak yapılan bir çalışmada karanlık fotoperiyotta besin alımını baskılayan biyolojik aktivitenin nesfatin-1'in orta parçasından (24-53 aa) kaynaklandığı, diğer N- ve C- terminal fragmanların ip enjeksiyonları sonrası besin alımında herhangi bir etkinin olmadığı belirlenmiştir (Shimizu ve ark., 2009a; Shimizu ve ark., 2009b).

Nesfatin-1'in periferik uygulanması sonrasında kan-beyin bariyerini geçtiği, dolaşımdaki nesfatin-1'in plazmadan parankim içine doğru olan difüzyonu sonrasında beyindeki beslenme merkezlerini doğrudan etkileyebildiği gösterilmiştir (Pan ve ark., 2007; Price ve ark., 2007). Fakat in vitroda nesfatin-1'in gangliyon nöronlarını aktive ettiğinin gösterilmesinin ardından nesfatin-1'in indirekt mekanizmasının olduğu da bildirilmiştir. Nesfatin-1'in indirekt etkisini, vagal afferentlerin aktivitesini etkileyerek ya da soliter traktustaki POMC ve CART nöronlarını aktive ederek yaptığı

bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 2009; Shimizu ve ark., 2009a). Bu sonuçlar aslında endojen nesfatin-1'in anoreksijenik düzenlenmeye aracılık ettiğini göstermektedir.

2.4.5. Nesfatin-1'in Beslenmeyi Düzenleyici Sistemlerle Olan İlişkisi

Nesfatin-1 sisteminin, beslenme davranışını düzenlediği bilinen diğer sistemlerle etkileşim içinde olduğu gösterilmiştir. Anoreksijenik peptit α -MSH'ın enjeksiyonu, hem PVN'deki NUCB2/nesfatin-1 nöronlarını hem de NUCB2 mRNA ekspresyonunu arttırmıştır. Buna karşılık nesfatin-1 tarafından indüklenmiş anoreksijenik etki, melanokortin 3/4 reseptör antagonisti SHU9119'un merkezi olarak verilmesiyle durdurulmuştur (Colmers, 2007). Nesfatin-1'in merkezi ya da periferal olarak verilmesi, soliter traktus çekirdeğindeki POMC/CART fenotipine sahip nöronların mRNA ekspresyonlarını arttırırken hipotalamik seviyedeki (PVN ve ARC) nöronların ekspresyonunu değiştirmemiştir (Oh-I ve ark. 2006; Shimizu ve ark. 2009a; Wernecke ve ark., 2014).

Nesfatin-1'in anoreksijenik etkisine, oksitosinerjik nöronların kısmen aracılık ettiği bildirilmiştir. Supraoptik ve paraventriküler çekirdekte yer alan magnoselüler nöroendokrin nöronlarda, oksitosinle nesfatin-1'in ko-lokalle olduğu bilinmektedir (Foo ve ark., 2008; Kohno ve ark., 2008). İn vitro çalışmalarda, PVN'deki oksitosinerjik nöronların eksitabilitesinin (uyarılabilirlik özelliği) nesfatin-1 peptidi tarafından sağlandığı (Price ve ark., 2008a), endojen nesfatin-1'in ise PVN dilimlerinde oksitosin salınımını değiştirdiği gösterilmiştir (Maejima ve ark., 2009). Paraventriküler çekirdeğe nesfatin-1'in enjeksiyonu, hem soliter traktustaki c-fos ekspresyonunu arttırmış hem de oksitosin sisteminin uyarılmasıyla beslenmeyi baskılamıştır. Bu sonuç, paraventriküler çekirdekten soliter traktusa doğru uzantılarını gönderen oksitosinerjik nöronların, anoreksiyi indükleyen nesfatin-1 tarafından modüle edildiğini düşündürmektedir (Maejima ve ark., 2009).

Nesfatin-1 sisteminin, beslenme davranışını düzenleyen CRF/CRF₂ reseptör sistemiyle de etkileşim halinde olduğu bulunmuştur. Parvoselüler nöroendokrin nöronlarda CRF ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonu gösterilmiştir (Foo ve ark., 2008; Kohno ve ark., 2008). Nesfatin-1'in CRF protein düzeylerini arttırdığı, CRF-ekspresyon eden nöronların eksitabilitesini etkilediği in vitro olarak gösterilmiştir (Gotoh ve ark., 2013; Price ve ark., 2008a). Ön beyine CRF₂ reseptör antagonisinin (astressin₂-B)

uygulanması ile nesfatin-1'in anoreksijenik etkisi tamamen ortadan kaldırılmıştır (Stengel ve ark., 2009a).

NUCB2/Nesfatin-1'in arkuat çekirdekteki NPY ile ko-lokalize olduğunun gösterilmesinin (Brailoiu ve ark., 2007; Oh-I ve ark., 2006) ardından in vitro da NPY-eksprese eden nöronların çoğunluğunun nesfatin-1 ile hiperpolarize olduğu bulunmuştur (Price ve ark., 2008b). Nesfatin-1'in NPY sinyalini azalma yönünde düzenleyerek (downregulation) besin alımını baskıladığı düşünülmüştür. Ayrıca Nesfatin-1'in sıçanlara icv enjeksiyonu hipotalamus ve soliter traktusdaki NPY mRNA ekspresyonunu azaltmıştır (Wernecke ve ark., 2014).

NUCB2/Nesfatin-1'in besin alımını düzenleyen diğer nörotransmitterler ve hormonal peptitlerle olan ilişkisi, immünohistokimyasal çalışmalarla da gösterilmiştir. Paraventriküler ve supraoptik çekirdekte yer alan magnoselüler nöroendokrin nöronlarda, vazopressin ve oksitosin ile nesfatin-1'in ko-lokalize olduğu gösterilmiştir (Kohno ve ark., 2008). Benzer şekilde parvoselüler nöroendokrin nöronlarda büyüme hormonunu salgılayıcı hormon, nörotensin, somatostatin, kortikotropin salgılayıcı hormon ve tiotropin salgılayıcı hormon ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonu, arkuat nükleus da POMC ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonu, lateral hipotalamus da MCH ile nesfatin-1'in ko-lokalizasyonları ikili immünohistokimya tekniği kullanılarak gösterilmiştir (Foo ve ark., 2008).

c-Fos immünreaktivitesinin nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanıldığı bir çalışmada, açlık sonrası tekrar beslenen sıçanların paraventriküler ve supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının aktive oldukları belirlenmiştir (Kohno ve ark., 2008). Paraventriküler çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının, kolesistokininin enjeksiyonunu takiben c-Fos eksprese ettikleri gösterilmiştir (Noetzel ve ark., 2009). Stres uygulanan deneklerde nesfatin-1 nöronlarının büyük kısmının c-Fos eksprese ettikleri görülmüştür (Goebel ve ark., 2009b). Nesfatin-1 uygulanan nöronal hücre kültüründe CREB fosforilasyon düzeyinin arttığı yani nesfatin-1'in nöronal aktivasyona etki ettiği rapor edilmiştir (Ishida ve ark., 2012).

2.5. Glutamat ve Hipotalamik Glutamaterjik Sistem

Glutamatın, merkezi sinir sistemindeki (MSS) tüm hücre tiplerinin sitozol ve mitokondrileri de dahil çoğu intraselüler kompartmanda bulunması, onun MSS'de metabolik etkilerinin olduğunu düşündürmüştür. Ancak ekstraselüler glutamat seviyelerinin regülasyonu, glutamatın memeli MSS'de bulunan başlıca eksitatör amino asit nörotransmitteri olarak rol oynadığını göstermiştir (Niciu ve ark., 2012).

Nöronal glutamat sentezi iki şekilde olur; (1) glikoz ve amino asit türevlerinden enerji metabolizması yoluyla *de novo* üretilen glutamat, (2) glutaminaz enziminin enzimatik aktivasyonu, glutamin taşıyıcılarının aktivitesi, glutamatın ekstraselüler boşluktan geri alım mekanizmalarının gerçekleşmesi ile glutaminden sentezlenen glutamat (Erecinska ve Silver, 1990).

Glutamaterjik sinapslar, presinaptik sinir terminalleri ile postsinaptik dendritik çıkıntılar (spine) (akso-dendritik sinapslar) veya komşu sinir uçları (akso-aksonal) arasındaki eksitatör geçiş yerleri olarak tanımlanır (Niciu ve ark., 2012). Glutamat aracılı nörotransmisyon, iyonotropik (Na^+ ve Ca^{2+} katyonlarına özgü iyon kanalları içerir) ve metabotropik reseptörler (G-proteinlerine bağlanarak ikincil haberciler üzerinden etki ederler) üzerinden gerçekleşir (Hollmann ve Heinemann, 1994; Niciu ve ark., 2012; Ozawa ve ark., 1998). Glutamat reseptörleri, hem eksitatör hem de inhibitör sinaptik iletişime aracılık eden membran proteinleridir (Gereau ve Swanson, 2008).

İyonotropik glutamat reseptörleri, glutamat agonistlerine olan bağlanma afiniteleri değerlendirilerek 3 alt gruba ayrılmaktadır; AMPA (α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol proprionik asit), Kainat (KA, 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin) ve NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleri (Bettler ve Mulle, 1995; Kew ve Kemp, 2005; Mori ve Mishina, 1995; Niciu ve ark., 2012).

İyonotropik glutamat reseptörlerinin en ilgi çekici özelliklerinden biri, memeli beynindeki ekspresyon profilleri ile alt birim kompozisyonuna dayanan kanal özelliklerinin çeşitliliğidir. AMPA reseptörleri GluA1-4, Kainat reseptörleri GluK1-5 ve NMDA reseptörleri GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B alt birimlerinden oluşur (Bettler ve Mulle, 1995; Mori ve Mishina, 1995). Bu alt birimler homomerik (tek bir alt birim) ya da heteromerik (birden fazla farklı alt birim kombinasyonu) olarak iyon kanalları oluştururlar ki bunlar fonksiyonel reseptör kanallarıdır (Alt ve ark., 2004;

Howe, 1996; Monyer ve ark., 1992). Glutamat agonistleri, seçici olarak farklı tipteki glutamat reseptörlerine bağlanarak taşıdıkları uyarıyı nöronlara aktarırlar ve nöronal aktivasyonu sağlarlar.

İmmünohistokimya çalışmaları ile hem glutamat-immünreaktif nöronların hipotalamustaki yaygın dağılımı hem de presinaptik glutamaterjik terminallerin varlığı supraoptik, paraventriküler, arkuat ve suprakiazmatik çekirdekte tanımlanmıştır (Van Den Pol ve ark., 1991; Van Den Pol ve ark., 1993). Ayrıca, in situ hibridizasyon ve Northern blot tekniklerinin kullanıldığı çoğu araştırmada, glutamat reseptör alt birimlerinin hipotalamik çekirdeklerdeki dağılımı, mRNA ve protein düzeylerinde gösterilmiştir (Eyigör ve ark., 2001; Eyigör ve ark., 2005; Van Den Pol ve ark., 1994; Wisden ve Seeburg, 1993). Van Den Pol ve ark., (1994)'nın in-situ hibridizasyon tekniği kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada, hipotalamustaki AMPA, Kainat ve NMDA reseptör ekspresyonlarının diğer beyin bölgelerinde bulunan transkriptlerle aynı boyut ve sayıda olduğu bildirilmiştir. Sıçan hipotalamusunda iyonotropik glutamat reseptör alt birimlerinin çalışıldığı başka bir çalışmada, AMPA, Kainat, NMDA reseptör alt birimlerinin hipotalamusun her tarafına heterojen bir şekilde dağıldığı; GluA1, GluA2, GluK5, GluN1, GluN2A ve GluN2B alt birimlerinin ise hipotalamusta en çok bulunan alt birimler olduğu gösterilmiştir (Eyigör ve ark., 2001).

2.5.1. NMDA Reseptörleri

NMDA reseptörleri, AMPA reseptörlerinden farklı bir şekilde merkezi sinir sistemindeki eksitator sinir iletimine aracılık eden, Ca^{2+} 'a yüksek geçirgenlik gösteren, Mg^{2+} ile voltaj-bağımlı şekilde bloklanabilen ve yavaş aktivasyon ve deaktivasyon kinetikleri ile karakterize edilen reseptörlerdir (Lester ve ark., 1990; MacDermott ve ark., 1986; Mayer ve ark., 1984; Nowak ve ark., 1984) Bu reseptörler, tüm beyinde yaygın olarak özellikle de ön beynin hipokampus CA1 bölgesinde bulunurlar (Monaghan ve ark., 1983; Monaghan ve ark., 1989).

NMDA reseptörü üzerinde ko-ligandların (glutamat ve glisin), poliaminlerin, kationların (Mg^{2+} , Zn^{2+} ve H^+) ve de disosiyatif anestetiklerin (ketamin) bağlandığı en az 6 bağlanma bölgesi tanımlanmıştır. NMDA, glutamat, aspartat ve glisin NMDA reseptörlerinin potent agonistleri iken fensiklidin (PCP), ketamin, MK801 (dizocilpine), xenon, dexanabinol ve agmatin reseptör antagonistleridir (Balla ve ark.,

2001; Javitt ve ark., 2004; Krystal ve ark., 1994; Moghaddam ve Adams, 1998; Patil ve ark., 2007; Umbricht ve ark., 2000).

NMDA reseptörleri (GluN) *NC-IUPHAR'a göre; GluN1, GluN2A-D ve GluN3A-B olarak isimlendirilen 7 alt birimden oluşur (Collingridge ve ark., 2009; Traynelis ve ark., 2010). NMDA reseptör alt birimleri homomerik reseptör kanalları oluşturamazlar. Heteromerik NMDA reseptörleri, dört GluN2A-D alt biriminden hangisinin GluN1 ile birlikte olabildiğine bağlı olarak değişik fonksiyonel özellikler gösterir. Bundan dolayı GluN1'e bağlı olan GluN2A-D alt birimleri, düzenleyici (modülatör) alt birim olarak kabul edilirken, heteromerik NMDA reseptörleri oluşturabilen GluN1 zorunlu alt birim olarak kabul edilir (Mori ve Mishina, 1995; Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993). İn-situ hibridizasyon çalışmaları, nöral gelişimde önemli rol oynayan GluN1 ekspresyonunun beynin her yerinde gerekli olduğunu göstermiştir. GluN1 geni olmayan (knock out) farelerin doğumlarından kısa bir süre sonra solunum yetersizliği sebebiyle öldükleri gözlenmiştir (Tsien ve ark., 1996).

2.5.2. AMPA Reseptörleri

AMPA reseptörleri, MSS'deki sinapsların çoğunda hızlı eksitatör sinir iletimine aracılık eder (Palmer ve ark., 2005). Başlangıçta kiskalat olarak isimlendirilen bu reseptörler, kiskalatın GluR üzerinde etkisi bulduktan sonra AMPA reseptörleri olarak isimlendirilmiştir. AMPA reseptör alt birimleri yeni nomenklatüre göre GluA1, GluA2, GluA3 ve GluA4 olarak tanımlanır.

AMPA reseptörleri, bu çoklu alt birimlerin oluşturduğu (GluA1/GluA2 veya GluA3/GluA4 gibi) homomerik veya heteromerik oligomerlerdir. AMPA reseptörlerinin fonksiyonel özelliklerindeki farklılıklar, bu alt birimlerin farklı kombinasyonlarının sonuçlarıdır.

* NC-IUPHAR: Uluslararası Farmakoloji Komitesi Reseptör Adlandırma ve İlaç Sınıflandırma Birliği

AMPA reseptörleri, agonistlerin veya antagonistlerin hareket edebileceği en az üç ayrı bağlanma bölgesine sahiptir: (1) glutamat bağlama bölgesi, (2) desensitizasyon ve (3) iyon içi kanal bağlama bölgesi. AMPA reseptör kanallarının Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} 'a geçirgen olduğu, AMPA, glutamat ve kainat'ın agonistleri (Kiskin ve ark., 1986; Tang ve ark., 1989; Trussell ve ark., 1988), quinoxalinedione 'ların (CNQX, DNQX, NBQX ve YM90K) ise potent antagonistleri olduğu (Ohmori ve ark., 1994; Sheardown ve ark., 1990) gösterilmiştir.

2.5.3. Kainat Reseptörleri

Kainat; AMPA reseptörünün güçlü bir agonisti olmasının yanısıra, farklı bir sınıf olan kainat reseptörleri üzerine spesifik etki gösterir. Hibridizasyon tekniği kullanılarak klonlanan kainat reseptör ailesi GluK1 (GluR5), GluK2 (GluR6), GluK3 (GluR7), GluK4 (KA1) ve GluK5 (KA2) olarak adlandırılan beş alt birimden oluşur (Bettler ve Mülle, 1995; Hollmann ve Heinemann, 1994; Seeburg, 1993). GluK1-GluK3 düşük afiniteli, %75-80 oranında benzer amino asit sekansına sahip, GluK4-GluK5 ise yüksek afiniteli, %70 oranında benzer amino asit sekansına sahip kainatın alt birim reseptörleridir. Düşük ve yüksek afiniteli bu iki grup arasındaki benzerlik oranı ise %40'dır. Fonksiyonel olmayan alt birimler GluK4 ve GluK5, homomerik fonksiyonel alt birimler GluK1-GluK3 ile ko-lokalize olup heteromerik kanal oluşturabilirler (Alt ve ark., 2004; Herb ve ark., 1992; Howe, 1996). AMPA ve kainat reseptörlerinin kanal özellikleri arasındaki en büyük fark, agoniste (kainat) verdikleri farklı desensitizasyon (yanıt) profillerinin varlığıdır. Kainat agonistine karşı olan desensitizasyonları AMPA reseptörlerine göre daha daha düşüktür (Ozawa ve ark., 1998).

AMPA ve kainat reseptörleri genellikle non-NMDA reseptörleri olarak isimlendirilir. Bu reseptörler, her iki reseptörle de etkileşime girebilen birkaç agonist ve antagonisti ortak kullanır (Lerma, 2003). Hem homomerik hem de heteromerik kainat reseptörleri agonist olarak glutamat, kainat, SYM2081, Domoate, AMPA, ATPA ve I-W'ye karşı yanıt oluştururken, decahydroisoquinolines'lar ile bloke olurlar (Alt ve ark., 2004).

Postsinaptik seviyede kainat reseptörleri, AMPA ve NMDA reseptörlerinin fonksiyonuna benzer şekilde sinaptik yükün (charge) bir kısmını taşırlar. Presinaptik

olarak da, hem eksitatör hem de inhibitör sinapslardaki transmitter salınımını (glutamat gibi) modüle ederler (Lerma, 2003).

2.6. Nöronal Aktivasyon Belirteçleri

Gen ifadesinin düzenlenmesi için her canlıda bulunan transkripsiyon faktörleri; nöronal fonksiyonu, nöronal uyarımı, nöronal gelişimi ve uzun süreli sinaptik plastisiteyi regüle eden nörogenezde etkin bir şekilde rol oynayan özgül proteinlerdir. Bir nöron, büyük miktarlarda sinaptik bir input (veri) aldığı anda kalsiyum iyonları hızlı bir şekilde sinaptik reseptörleri (ör: NMDA) ya da voltaj kapılı kalsiyum kanallarını kullanarak nöronlara doğru akar. Bu akış, çoğu kalsiyum-bağımlı kinaz kaskadını etkinleştirerek bir dizi transkripsiyon faktörünü aktifleştirir ve hızlıca hedef genlerin indüksiyonunu tetikler (Bito ve ark., 1997; Flavell ve Greenberg, 2008; Kawashima ve ark., 2014).

2.6.1. Aktivasyon belirteci olarak kullanılan proteinler

Bu grupta yer alan proteinler aktive nöronlarda hızla sentezlenip çekirdeğe yerleşir ve nöronda genetik aktiviteyi başlatırlar. Bu proteinlerin bir kısmı fosforile olarak aktif hale geçerler. İmmünohistokimyasal olarak proteinlerin çekirdekteki lokalizasyonlarının gösterilmesi nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanılmaktadır.

2.6.1.1. c-Fos

Bir transkripsiyon faktörü olan *c-fos* geninin ve bu genin protein ürünü olan c-Fos'un geçici olarak ekspresyonu, nöronların aktive olduğunu belirlemede bir parametre olarak kullanılmaktadır (Hoffman ve ark., 1993; Sagar ve ark., 1988). İn situ hibritleme ya da immünohistokimyasal olarak mRNA veya protein düzeyinde belirlenebilen c-Fos ekspresyonu, aktive olan nöronların fonksiyonel anatomik haritalanmasında kullanılmaktadır. c-Fos proteininin nöron çekirdeğinde lokalize olması aktive olan nöronun fenotipini belirlemede herhangi bir sitoplazmik yapının kullanılmasına ve ikili immünohistokimyasal işaretleme yapılabilmesine olanak tanımaktadır (Eriksson ve ark., 1996). Bazal durumlarda nöronlarda minimal düzeyde olan c-Fos ekspresyonu, belirli fizyolojik durumlarda artar ve bunun belirlenmesiyle aktive olan sistem hakkında bilgi edinilebilir. Deneysel olarak bir uyarın

uygulandığında, uyarı takip eden 60-90 dakika içerisinde hücrelerde c-Fos immünoreaktivitesi belirlenebilir ve bu hücrelerin fonksiyonel olarak aktive oldukları gösterilebilir.

Nöroendokrinoloji, c-Fos'un nöronal aktivasyon belirteci olarak sıklıkla kullanıldığı alanlardan biridir (Eriksson ve ark., 1996; Hoffman ve ark., 1993; Hoffman ve Lyo, 2002). Bizim laboratuvarımızda da kullanılan bu yaklaşımla, farklı nörotransmitterlerin etkisiyle aktive olan nöroendokrin sistemlerin gösterilmesi; bu uyarının farklı antagonistlerle bloklanması ile aktivasyonda yer alan nörotransmitter reseptörlerinin belirlenmesi; belirli bir uyarı ile (kimyasal, davranışsal veya fiziki) aktive olan nöroendokrin hipotalamik alanların işaretlenmesi ya da nöroendokrin sistemlerin fizyolojik olarak uyarıldığı bilinen durumlarda (ör: luteinizan hormon pikinde gonadotropin salıverici hormon nöronları, sıvı kaybında vazopressin nöronları, laktasyonda oksitosin nöronları) aktive olan nöron dağılımı ve bu nöronların özelliklerinin belirlenmesi olasıdır.

2.6.1.2. Fosforile CREB

c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein (CREB), nörogenezde, nöronal ve sinaptik plastisitede, nöronal korumada, gelişen nöronların hayatta kalmasında ve büyümesinde, nöronal prekürsörlerin proliferasyonunda ve nöronların protein sentezine yönelik aktivasyonunda rol alan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Carlezon ve ark., 2005; Mayr ve Montminy, 2001). CREB, hücre dışı bir uyarı ile stimüle edildiğinde fosforile olur ve aktifleşir. Fosforile CREB (pCREB) çekirdekte genlerin özgün sentezini başlatır ve birçok hücresel cevabın ortaya çıkmasına neden olur. CREB'in transkripsiyonel aktivasyonu cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) tarafından Ser133 amino asitinde fosforillenmesi ile gerçekleşir. Bu sinyal yolağında ligand, G kapılı hücre reseptörüne bağlanır. GTP bağlı G protein, α alt birimi adenil siklaza bağlanır, ATP'den cAMP oluşur. İkincil mesajcı olan cAMP, PKA'nın düzenleyici (R) alt birimine bağlanır ve PKA'nın katalitik alt birimi serbestleşir. R alt birimi fosfodiesteraz tarafından yıkılırken aktifleşen katalitik alt birim çekirdek içine geçer. cAMP yanıt elemanına bağlı CREB'i fosforiller ve genlerin özgün sentezi başlatılır (Lonze ve Ginty, 2002).

pCREB varlığının gösterilmesi nöronların aktivasyonunu belirleyici olarak kullanılmaktadır. pCREB varlığı, hormonal ve metabolik sinyallerin gösterilmesinde (Altarejos ve Montminy, 2011), glutamat gibi nörotransmitterlerin etkilerinin belirlenmesinde (Balazs, 2006) önemli bir aktivasyon belirtecidir. CREB hipotalamik nöronların regülasyonunda da yer almaktadır (Kageyama ve Suda, 2010; Lechan ve Fekete, 2006). pCREB immünreaksiyonunun nöron çekirdeklerinde belirlenmesinin nöronal aktivasyon belirteci olarak kullanıldığı çalışmalarda, östrojen uygulamasına bağlı olarak hipotalamik çekirdeklerde aktive olan nöron sayısının arttığı (Gu ve ark., 1996), MSH uygulanan deneklerde TRH ve CRH nöronlarında aktivasyon görüldüğü (pCREB pozitif) bildirilmiştir (Sarkar ve ark., 2002). Stres uygulanan deneklerde PVN ve arkuat çekirdek nöronlarında aktivasyon oranının arttığı (Kwon ve ark., 2006), strese bağlı olarak artan pCREB pozitif nöron sayısının glukokortikoid uygulamasıyla azaldığı gösterilmiştir (Legradi ve ark., 1997). Suprakiazmatik çekirdekte NMDA, AMPA ve kainik asit uygulamalarının pCREB içeren nöron sayısını arttırdığı, dolayısıyla glutamat agonistlerinin nöronal aktivasyonu tetiklediği rapor edilmiştir (McNulty ve ark., 1998). Açlık durumunda oreksin nöronlarında pCREB pozitifliğinin arttığı ve bu artışın erkek deneklerle karşılaştırıldığında dişi deneklerden daha fazla olduğu belirtilmiştir (Funabashi ve ark., 2009).

2.6.1.3. Fosforile STAT

STAT (sinyal çevirmicileri ve transkripsiyon aktivatörleri) proteinleri santral ve periferik sinir sisteminde çeşitli biyolojik faktörlere aracılık eden, transkripsiyonu aktive eden bir sinyal molekülleridir. STAT proteinleri aynı zamanda hücrelerde farklılaşmayı, hayatta kalmayı ve büyümeyi düzenler. Bu proteinler inaktif olarak sitoplazma da yer alırlar ve etkinleşince çekirdeğe geçerler. Bu transkripsiyon faktörü sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin sinyal iletiminde yer almaktadır (Darnell ve ark., 1994; Darnell, 1997). STAT ailesi; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a/b ve STAT6'dan oluşmaktadır. STAT proteinlerinin aktivasyonu serin/treonin rezidülerinin fosforillenmesi ile gerçekleşir. Bir reseptöre bağlanan ligand, reseptör-bağlantılı JAK tirozin kinaz sistemi yoluyla, inaktif transkripsiyon faktörü STAT'ın fosforile olmasını sağlar ve fosforillenen STAT hedef genlerin transkripsiyonunu aktive edeceği çekirdeğe geçer. Çekirdekte bulunan DNA moleküle bağlanan STAT,

gen aktivasyonunu başlatmış olur (Bromberg ve Darnell, 2000; Bromberg ve Chen, 2001). Bu hücre içi haberci sistemi JAK/STAT yolağı olarak da tanımlanmaktadır.

Çekirdekte belirlenen pSTAT immünreaksiyonu o nöronun transkripsiyonel aktivasyona başladığının, yani aktive olduğunun gösterilmesi yönünde de kullanılmaktadır (Ma ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2011). Hipotalamusta prolaktinin ve leptinin etkileri pSTAT3 ve pSTAT5 ekspresyonunun belirlenmesiyle araştırılmıştır (Brown ve ark., 2012; Ladyman ve ark., 2012).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DeneY Hayvanları

Tez çalışması, Uludağ Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 15.07.2014 tarih ve 2014-10/02 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak yapılmıştır. Çalışma bütçesinin tamamı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK), Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı'nın 1001-113S377 numaralı projesi kapsamında karşılanmıştır.

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi DeneY Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından temin edilen Sprague Dawley cinsi 250-300 gr ağırlığındaki dişi ve erkek sıçanlar kullanılmıştır.

3.2. Dokuların İmmünohistokimyasal İşaretlemeYer için Hazırlanması

Amaca uygun olarak glutamat agonist ve antagonist enjeksiyonları deneklere intraperitoneal enjeksiyon (i.p.) yolu ile yapıldı. Enjeksiyonları yapılan tüm deneklerin, son enjeksiyonlarından 90 dk. sonra derin eter anestezisi altında toraksları açılarak aortaya kateter yerleştirildi. Serum fizyolojik (%0,9 NaCl), perfüzyon pompası yardımıyla damar sistemine gönderilerek deneklerin dolaşım sistemleri kandan temizlendi. Sonrasında denekler 0,13 M Sorenson'un fosfat tamponu¹ ile hazırlanan %4 paraformaldehitin² kullanıldığı transkardiyak perfüzyon fiksasyon

1. Sorenson'un Fosfat Tamponununun 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 [KH_2PO_4 (0,13 M), (Merck)] 17,68 g/lt. Her iki solüsyon buzdolabında saklanır. Solüsyon A üzerine solüsyon B eklenerek pH 7,4'e ayarlanır.

2. %4'lük Paraformaldehitin Hazırlanışı: 100 ml distile suda 20 g (%4'lük için 40 gr) paraformaldehit (Merck, Cat. No: 104005) magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı üzerinde 58°C'ye kadar ısıtılarak çözülür. Sıcaklık kesilir. Solüsyon berraklaşınca kadar 1 N NaOH (Merck) ilave edilir. Filtre kağıdından süzöldükten sonra 0,13 M'lık fosfat tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır. pH ölçümü yapılarak konsantre hidroklorik asit (HCl) ya da 1 N NaOH ile son pH 7,4'e ayarlanır.

yöntemi ile sakrifiye edildi ve beyinleri çıkartıldı. Paraformaldehitte tüm gece post-fiksasyona bırakılan bu beyinlerden vibratom cihazı ile hipotalamusun rostra-kaudal ekseninin tamamını içerecek şekilde 5 seri halinde cam sintilasyon viallerine 50 µm'lik koronal kesitler toplandı. 0,05 M'lık Tris-HCl tamponu³ ile 3 kez yıkamanın ardından fiksatiften arındırılan kesitler kriyoprotektan⁴ madde içinde -20°C'de saklandı. Daha sonra bu kesitlere aşağıdaki ilgili bölümlerde basamakları ayrıntılı bir şekilde verilen protokoller kullanılarak indirekt immünoperoksidaz yöntemi ya da ikili immünofloresan yöntemleri ile işaretlemeler yapıldı.

3.3. İmmünohistokimyasal İşlemlerde Takip Edilen Genel Kurallar

İmmünohistokimyasal işlemlerin tümü cam viallerde yüzen kesitlere uygulandı. Kesitlerin inkübasyon ve yıkama işlemleri, orbital sallayıcı yardımı ile uygun ajitasyonla gerçekleştirildi. Protokollerdeki ana basamaklar arasında (non-spesifik bağlanmayı bloklamak ile primer antikor inkübasyonu arası hariç), kesitler 0,05 M'lık Tris-HCl tamponu (pH:7,6) ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmayı bloklamak ve tüm antikorları dilüe etmek için bloklayıcı tampon olarak Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %10'luk bloklayıcı serum⁵ kullanıldı.

Çalışmada kullanılan antikorlar ile yapılan immünohistokimyasal boyamaların özgünlükleri kontrol çalışmalarıyla belirlendi. Kontrol çalışmalarında esas immünohistokimyasal boyamaya eş zamanlı olarak kontrol boyaması yapıldı ve bu boyama protokolünde primer antikor basamağı yerine normal bloklayıcı serum kullanıldı. Kontrol boyamaları değerlendirildiğinde hiç bir işaretlenme gözlenmedi. Bu sonuç antikorum özgün işaretlemesinin kontrolü olarak değerlendirildi.

3. Tris Tamponunun (0.05 M) Hazırlanışı: 6 gr Trizma base (Merck, Cat. No: 108387) 1000 ml distile suda çözünür. Konsantre hidroklorik asit (HCl) ile pH 7,6'ya ayarlanır.

4. Kriyoprotektanın 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) kullanılır. Maddeler verilen sıraya göre eklenir. Karışım distile su ile 1 litreye tamamlanır.

5. Bloklayıcı Serumun Hazırlanışı: İnaktive halde bulunan %10'luk normal at serumu 56°C'lik sıcak su banyosunda aktive edilir. %0,1 sodyum azid ve %0,2 triton-X 100 eklendikten sonra karışım Tris tamponu ile 1 lt'ye tamamlanır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Antikorlar için Uygun Dilüsyonların ve İnkübasyon Koşullarının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında kullanılan primer antikorlar (Tablo 2) için optimum dilüsyon oranı, 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.

Tablo 2. Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikorların isimleri

Antikor	Üretici Firma	Katalog no
Tavşan anti-p-STAT5	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-nesfatin-1	Phoenix Pharmaceuticals, Inc	H-003-22

Antijen Retrieval (AR) İşlemi: Kriyoprotektandan arındırılan primer antikor inkübasyonu yapılacak bazı kesitlere, optimum işaretlenmenin elde edilebilmesi için dokudaki antijenitenin yeniden kazandırılması amacıyla AR işlemi uygulandı. Bu amaçla 50 mM trisodyum sitrat tamponu⁶ (pH:6) veya 1 mM EDTA solüsyonu⁷ (pH 8) AR işlemi sırasında kullanıldı. Kesitler, 30 dk süreyle 85°C’ye ayarlanmış etüvde ön ısıtması yapılmış AR solüsyonu (solüsyon son sıcaklığı 73-75°C) içinde inkübe edildi. Sonrasında viallerin kapağı açılmadan oda sıcaklığında 15 dk. süreyle aynı solüsyon içinde bekletildi. Kullanılan AR protokolleri Tablo 3’de verilmiştir.

6. 50 mM Sodyum Sitrat Tamponu Hazırlanışı: Trinatrium sitrat pentahidrat 17,858g/1000 ml dH₂O. pH 6’ya ayarlanır.

7. 1 mM EDTA Tamponu Hazırlanışı: Etilendiamin tetra asetik asit disodyum 2 sulu, 0,372 g/1000 ml dH₂O. pH 8’e ayarlanır.

Endojen peroksidaz aktivitesinin baskılanması: Çalışmamızda kullanılmak üzere seçilen bazı antikolarla yapılan ön çalışmalarda, immün işaretleme yöntemleri sonrasında zemin boyanmasının ortaya çıktığı gözlemlendi. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesine bağlı bu tip işaretlenmeyi önlemek için, AR işlemi sonrası yıkamayı takiben Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %3 H₂O₂ solüsyonu ya da %40 metanolde hazırlanmış %1 H₂O₂ solüsyonunda inkübe edildi.

Çalışma kapsamında kullanılması planlanan pSTAT3 antikoruna ile yapılan ön çalışmalarda iki farklı üretici firmaya ait pSTAT3 antikoruna denenmesine karşın optimum boyanma elde edilemedi. Aynı şekilde iyonotropik glutamat reseptör alt birimleri olan GluK1, GluK2 ve GluK3 reseptör proteinleri için spesifik olan antikolar ile de pozitif sonuçlar alınamadı. Bu nedenle ikili immünoperoksidaz işaretleme protokollerinde c-Fos, pCREB ve pSTAT5 antikoları, ikili immünofloresan boyamalarda ise her üç reseptör alt birim proteinini de tanıdığına bildiğimiz GluK1/2/3 antikoruna kullanıldı.

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

Test Edilen Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi	İnkübasyon Sıcaklıkları	Endojen Peroksidaz Aktivitesinin Bloklanması		AR İşlemi	
				% H ₂ O ₂	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-GluN1	1:300	48 saat	+4°C	%3	10 dk.	EDTA	8
Fare anti-GluN2A	1:1.000	48 saat	+4°C	-	-	-	-
Tavşan anti-nesfatin-1	1:10.000	1 gece	+4°C	-	-	-	-
Tavşan anti-pSTAT5	1:2.000	6 gece	+4°C	%1	30 dk	EDTA	8
Tavşan anti-c-Fos	1:10.000	1 gece	OS	-	-	-	-
Tavşan anti-pCREB	1:5.000	1 gece	OS	-	-	-	-

OS: Oda sıcaklığı

3.5. Deney Prosedürü:

Tez deneyleri, hipotezin test edilmesine yönelik olarak belirlenen iki özgün amaç doğrultusunda planlandı.

3.5.1. Özgün Amaç 1: Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün araştırılması (Farklı glutamat reseptör agonistlerinin -Kainik asit, AMPA ve NMDA- nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna olan etkisinin gösterilmesi)

Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünü belirlemek amacıyla kurgulanan bu bölümde, deneklere üç farklı iyonotropik glutamat reseptör alt biriminin agonistleri i.p. yolla verildi. Bu amaçla glutamat agonistleri kainik asit (AMPA/kainat reseptör agonisti), AMPA (AMPA reseptör agonisti) ve NMDA (NMDA reseptör agonisti) kullanıldı. Özgün glutamat reseptör antagonistlerinin nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyona (transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarındaki artışla belirlenen) etkilerinin araştırılması amacıyla, deneklere CNQX (kainat/AMPA reseptör antagonisti) ve MK801 (NMDA reseptör antagonisti) i.p. yolla enjekte edildi. Glutamat agonistlerinin, nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisinin araştırılacağı deneyde denekler 3 grup olacak şekilde sınıflandırıldı. Her grupta 5'i erkek 5'i dişi olmak üzere toplam 10 denek yer almıştır.

Grup I (Kontrol grubu): Deneklere i.p. fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) enjeksiyonu yapıldı.

Grup II (Agonist grubu): Deneklere i.p. yolla agonistlerden biri verildi.

Grup III (Antagonist grubu): Agonist enjeksiyonundan 15 dk. önce ilgili reseptörün antagonisti i.p. olarak verildi.

Çalışmada kullanılan glutamat agonist ve antagonistlerinin dozları Tablo 4'te detaylarıyla verilmiştir. Uygulanan bu dozların nöronal aktivite oluşturan ancak nörotoksik etki yaratmayan dozlar olarak belirlenmesine rağmen, deneylerde bireysel olarak ortaya çıkabilecek olası nörotoksik etkiler değerlendirildi ve nörotoksisite olduğu düşünülen denekler deney grubuna katılmadı. Bu amaçla denekler enjeksiyonu takiben sakrifiye edilecekleri 90 dakika içerisinde gözlem altında tutuldu. Nörotoksisite belirteçleri olarak kullanılan hareketsiz kalma, baş sallama, silkelenme,

motor nöbetler (çene, yüz kasılmaları, ön ekstremite tremoru, postür kontrolünün kaybı) ve status epileptikus varlığı deneklerde ayrıntılarıyla izlendi.

Enjeksiyonlara her gün saat 09:00 da başlandı. Son enjeksiyonlardan 90 dakika sonra tüm denekler perfüzyon fiksasyonu ile sakrifiye edilerek deneklerin seri beyin kesitleri hazırlandı. Glutamat agonistlerinin nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunu sağlayıp sağlamadığı, dolayısıyla da glutamaterjik sistemin etkinliği, ikili immünoperoksidaz işaretleme yöntemi kullanılarak incelendi. Nesfatin-1 nöronlarındaki hücre içi aktivasyon yollarını değerlendirmek için sıklıkla nöronal aktivitenin değerlendirilmesinde, aktivasyon belirteci olarak kullanılan c-Fos, pCREB ve pSTAT5 proteinlerinin ekspresyonlarına ayrı ayrı bakıldı. Bu bölümde kullanılan ikili immün işaretleme protokolünün şematize edilmiş hali şekil 6'da verilmiştir.

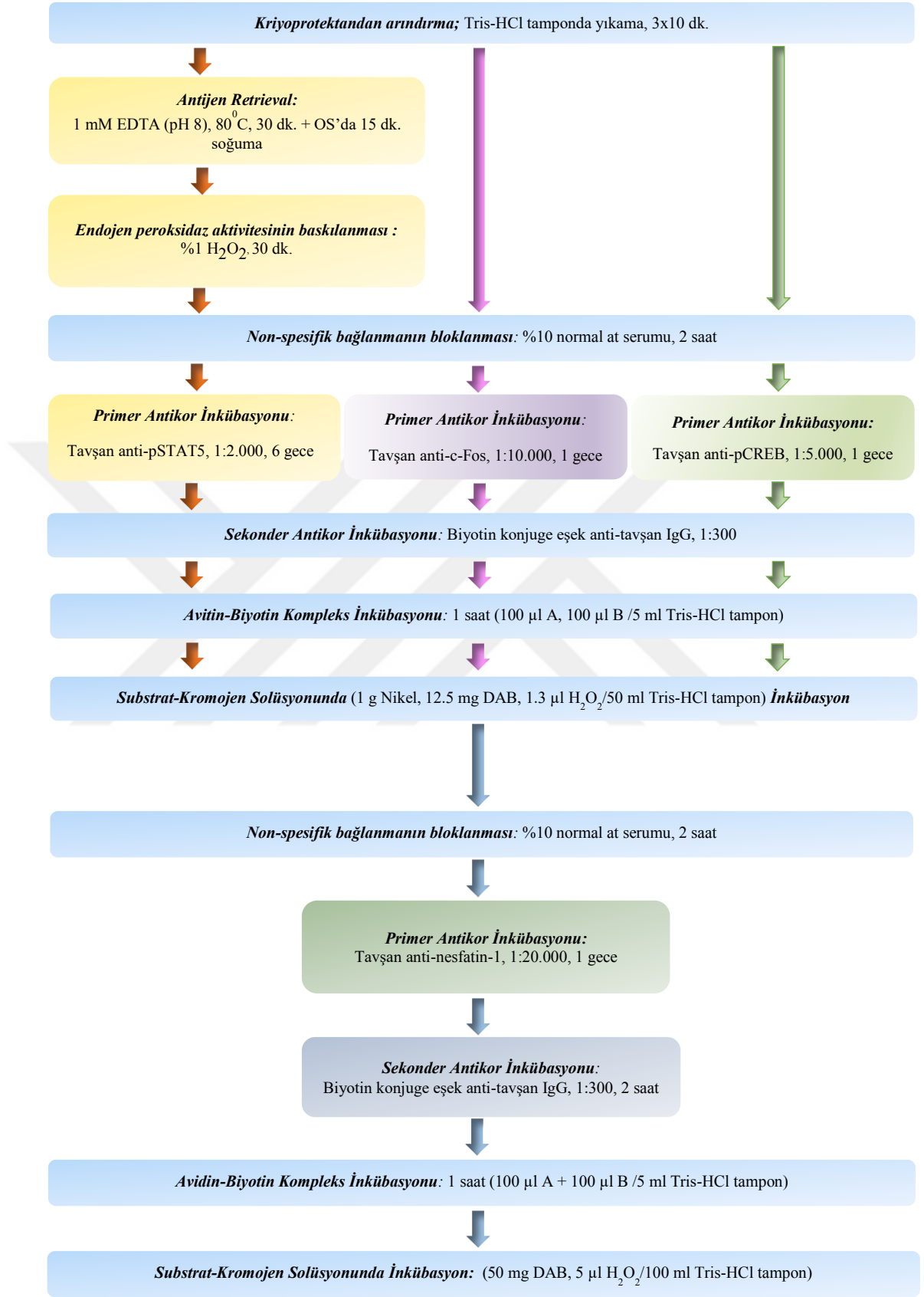
Tablo 4. Çalışmada kullanılan glutamat reseptör agonist ve antagonistlerinin gruplandırılmaları

Glutamat reseptör alt birimi	Grubun Adı	Gruptaki denek sayısı (n)	Dozaj ve Enjeksiyonun Miktarı
Kainat reseptör alt birimi	Kontrol grubu	n=10 (5 erkek+5 dişi)	i.p., 300 µl/denek
	Agonist grubu (Kainik asit)	n=10 (5 erkek+5 dişi)	2.5 mg/kg, i.p., 300 µl/denek
	Antagonist grubu (CNQX)	n=10 (5 erkek+5 dişi)	2 mg/kg, i.p., 300 µl/denek
AMPA reseptör alt birimi	Kontrol grubu	n=10 (5 erkek+5 dişi)	i.p., 750 µl/denek
	Agonist grubu (AMPA)	n=10 (5 erkek+5 dişi)	5 mg/kg, i.p., 750 µl/denek
	Antagonist grubu (CNQX)	n=10 (5 erkek+5 dişi)	2 mg/kg, i.p., 300 µl/denek
NMDA reseptör alt birimi	Kontrol grubu	n=10 (5 erkek+5 dişi)	i.p., 2 ml/denek
	Agonist grubu (NMDA)	n=10 (5 erkek+5 dişi)	100 mg/kg, i.p., 2 ml/denek
	Antagonist grubu (MK801)	n=10 (5 erkek+5 dişi)	1 mg/kg, i.p., 300 µl/denek

Özgün Amaç 1'e yönelik gerçekleştirilen deneylerde kullanılan ikili indirekt immünperoksidaz işaretleme protokolü

1. Kesitler, kriyoprotektanın arındırılması için Tris-HCl tamponunda 3x10 dk. yıkandı.
2. Yıkama işleminden sonra, sadece pSTAT5 primer antikor inkübasyonu yapılacak olan kesitlere, antijenitenin geri kazandırılması amacıyla antijen retrieval [AR=1mM EDTA, (pH=8), etüv sıcaklığı 80°C, 30 dk.] işlemi uygulandı.
3. 15 dk. oda sıcaklığında aynı solüsyon içinde bekletilen AR'li kesitlere, endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için 30 dk. süreyle %1'lik H₂O₂ (%40'lık metanolde hazırlanmış) muamelesi yapıldı.
4. Kesitler, Tris-HCl tamponunda 3x10 dk. yıkandı.

5. Non-spesifik bağlanmanın bloklanması amacıyla, %10'luk normal at serumu (Tris-HCl tamponunda hazırlanmış) ile 2 saat süreyle inkübe edildi.
6. Bloklayıcı serum aşamasından sonra kesitler, tavşan anti-c-Fos, tavşan anti-pCREB ve tavşan anti-pSTAT5 primer antikoları ile inkübasyon süreleri ve dilüsyon oranları değişkenlik gösterecek şekilde (Tablo 3'de verilmiştir) inkübe edildi.
7. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
8. Sekonder antikor inkübasyonu için biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:300) antikor solüsyonunda 2 saat bekletildi.
9. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
10. Sekonder antikordan arındırılan kesitler, avidin-biyotin kompleksi (ABC) solüsyonunda (100 µl A, 100 µl B solüsyonu/ 5 ml Tris-HCl tamponu) 1 saat süreyle inkübe edildi.
11. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
12. Substrat-Kromojen solüsyonu olan Nikel-DAB'da (1 g Nikel, 12,5 mg DAB, 1,3 µl H₂O₂/ 50 ml Tris-HCl tamponunda) 6 dk. inkübe edildi.
13. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
14. Kesitler tekrar bloklayıcı serum solüsyonunda 2 saat süreyle inkübe edildi.
15. Primer antikor inkübasyonu için kesitler, tavşan anti-nesfatin-1 antikoru (1:20,000) ile tüm gece oda sıcaklığında bekletildi.
16. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
17. Sekonder antikor inkübasyonu için biyotin konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:300) ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
18. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
19. Avidin-biyotin kompleksi solüsyonu ile 1 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi.
20. Kesitler, Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
21. Ardından kesitlere substrat kromojen solüsyonu olarak DAB (25 mg DAB, 2,6 µl H₂O₂/ 50 ml Tris-HCl tamponu) 4 dk. süreyle uygulandı ve antikor-antijen-enzim kompleksi sitoplazmada görünür hale getirildi.
22. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
23. Fırça yardımıyla lamlara alınan kesitler, havada kurutulduktan sonra DPX ile kapatıldı.



OS:oda sıcaklığı

Şekil 6. İkili indirekt immünoperoxidaz işaretleme protokolünün şematize edilmiş hali

3.5.2. Özgün Amaç 2: Nesfatin-1 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birim protein ekspresyonlarının gösterilmesi (Kainat için GluK1, GluK2, GluK3 ve GLUK5; AMPA için GluA1, GluA2, GluA3 ve GluA4; NMDA için GluN1 ve GluN2A)

Herhangi bir enjeksiyon yapılmamış 10 dişi ve 10 erkek sıçandan transkardiyak perfüzyon yöntemi ile beyinler elde edildi. Bu deneklere ait beyinlerden vibratom cihazı ile 50 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Sonrasında bu kesitlere, ikili immünofloresan işaretleme yöntem protokolü uygulanarak immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi.

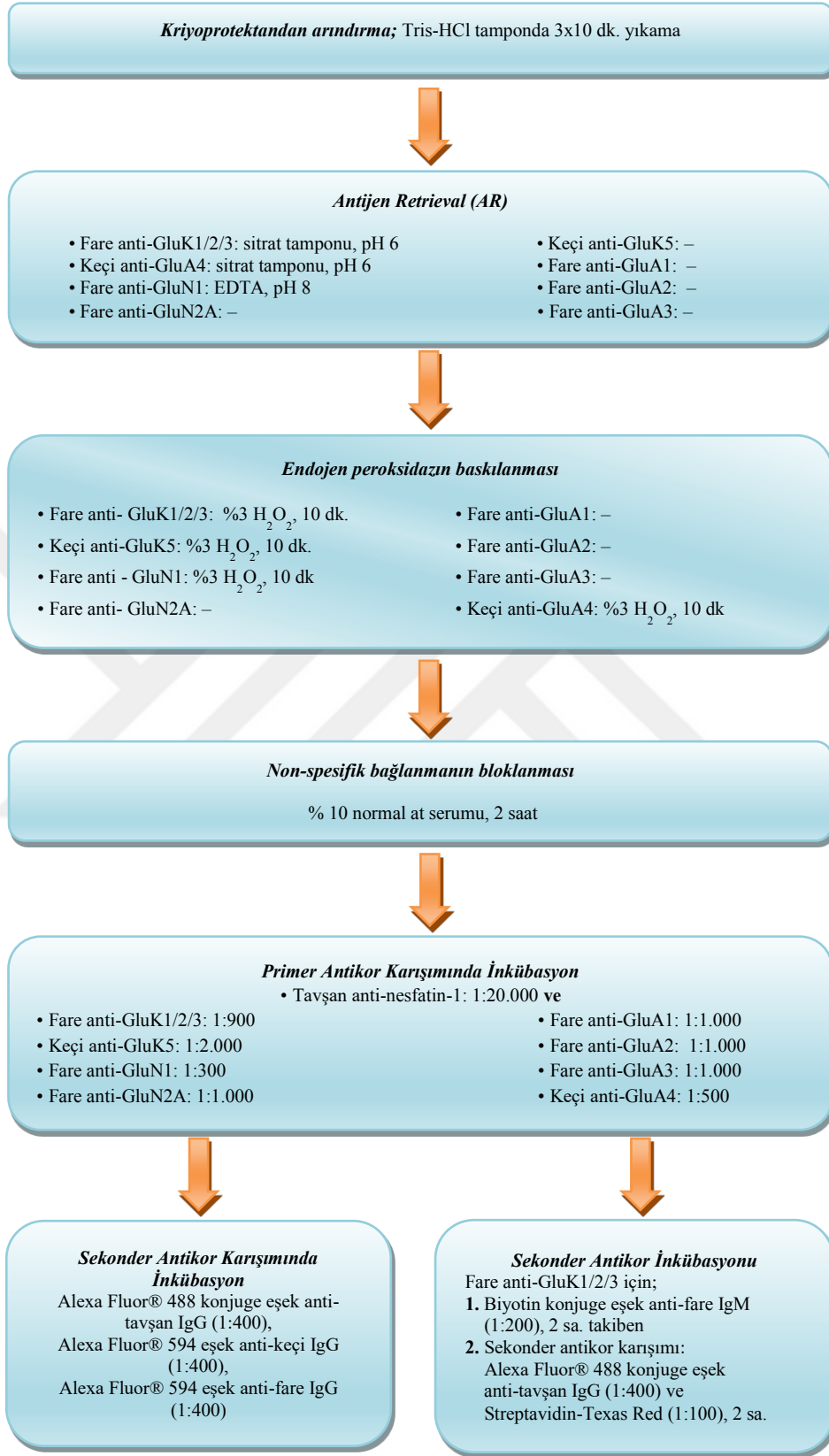
Özgün Amaç 2'ye yönelik gerçekleştirilen deneylerde kullanılan ikili immünofloresan işaretleme protokolü

1. Kesitler, kriyoprotektanın arındırılması için Tris-HCl tamponunda 3x10 dk. yıkandı.
2. Antijenitenin geri kazandırılması için kesitlere, 1 mM EDTA'da (pH:8) ya da sodyum sitrat tamponunda (pH:6) 80⁰C'de 30 dk. boyunca AR işlemi uygulandı. Etüvden çıkarılan kesitler, oda sıcaklığında aynı solüsyon içinde 15 dk. bekletildi.
3. Tris-HCl tamponu ile 3x10 dk. yıkandı.
4. Endojen peroksidaz aktivitesinin baskılanması için kesitler, Tris-HCl tamponunda hazırlanmış %3'lük H₂O₂'de 10 dk. bekletildi.
5. Non-spesifik bağlanmanın bloklanması amacıyla %10'luk normal at serumu (Tris-HCl tamponunda hazırlanmış) ile 2 saat süreyle inkübe edildi.
6. Kesitler, primer antikor karışımında [tavşan anti-nesfatin-1 (1:10,000) ile glutamat reseptör alt birim proteinlerinden birine karşı geliştirilmiş antikorların karışımını içeren solüsyon] değişen sürelerde (48 ve 72 saat) inkübe edildi. Karışımında kullanılan antikorların dilüsyon oranları ile inkübasyon süreleri tablo 3'de ayrıntılarıyla verildi.
7. Sekonder antikor uygulaması aşamasında ise sekonder antikor ve/veya sekonder antikor karışımını ile inkübasyon gerçekleştirildi.
 - a. Tavşan anti-nesfatin-1, GluK5, GluA1, GluA2, GluA3, GluA4, GluN1 ve GluN2A için; Alexa Fluor ® 488 konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:400), Alexa

Fluor ® 594 konjuge eşek anti-keçi IgG (1:400) ve Alexa Fluor ® 594 konjuge eşek anti-fare IgG (1:400) antikoları ile 2 saatlik inkübasyon yapıldı.

- b.** Fare anti-GluK1/2/3 için; biyotin-konjuge eşek anti-fare IgM (1:200) solüsyonunda 2 saatlik inkübasyonun ardından sekonder antikor karışımında [Alexa Fluor ® 488 konjuge eşek anti-tavşan IgG (1:400) ve streptavidin-TR (1:100)] 2 saat boyunca inkübe edildi.
- 8.** Tüm kesitler, Tris-HCl tampon ile 3x10 dk. yıkamanın ardından lamlara alınıp kurutuldu.
- 9.** Mikroskopik değerlendirme ve fotoğraflama öncesinde kesitler Prolong® Antifade ile kapatıldı.

Protokoldeki tüm basamaklar arasında (non-spesifik bağlanmanın bloklanması basamağı ile primer antikor uygulanması basamağı arası hariç) kesitler Tris-HCl tamponda 3x10 dakika yıkandı. Nesfatinerjik nöronlarda eksprese olan glutamat reseptör alt birim proteinlerinin belirlenmesinde kullanılan ikili immünofloresan işaretleme protokolünün şematize edilmiş hali şekil 7’de verildi.



Şekil 7. İkili immüno Floresan işaretleme protokolünün şematize edilmiş hali

3.6. Preparatların İncelenmesi ve İstatistiksel Analiz

İkili immunoperoksidaz boyaması yapılan kesitlerin incelemesi Olympus BX–50 fotomikroskopta, ikili immünofloresan yöntemle işaretlenen kesitler ise Olympus BX–FLA Reflected Light Flourescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX–50 mikroskopla, 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD color camera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde gerçekleştirildi.

Tez projesi kapsamında yapılan immün işaretlemeler, beyin kesitleri atlasına (Paxinos ve Watson, 2009) göre belirlenen koordinatlar arasındaki (SON için bregma –0.48 mm ile –1.44 mm, PVN için bregma –1.32 mm ile –1.92 mm ve ARC için bregma –2.12 mm ile –3.80 mm) kesitlerde değerlendirildi. Hücre sayımı için rostrakaudal düzlemde birbirine eşit uzaklıkta 5 farklı seviyeden alınan kesitler kullanıldı ve her denek için kesitlerin aynı koordinatta olmasına dikkat edildi. Her denekten 5 seri halinde cam viallere alınan kesitlerin sadece bir serisinde yer alan kesitler boyandı ve boyama işlemi tüm deneklerin bir serisindeki kesitlerin tamamına aynı anda yapıldı. Her vialdeki 250 µm aralıklarla alınan \cong 30 seri kesitten tümü lamlara alındıktan sonra yukarıda belirtilen koordinatlar arasındaki SON, PVN veya ARC’de yerleşik ilgili nesfatin-1 nöronları, çekirdeklerin tamamında (rastgele örnekleme yapılmaksızın) sayıldı. SON için 3 kesit, PVN için 2 kesit ve ARC için 3 kesit sayımından elde edilen sayılar istatistiki değerlendirme de kullanıldı.

İkili immünoperoksidaz yöntemi ile işaretlenen kesitlerde nesfatin-1 peptiti için immünopozitif olan tüm nöronlar sayıldı. Bu nöronların c-Fos, pSTAT5 ve pCREB-immünoreaktif olanlarının (ikili işaretlenenler) sayıları da belirlendi. Sonrasında her denek için; ikili işaretlenen nöronların ilgili peptite ait antikor ile işaretli tüm nöronlara (hem ikili hem de sadece peptit işaretli nöronların toplamı) oranı hesaplandı. Her bir denek için elde edilen yüzdelerin grup içi ortalama ve standart hataları belirlendi.

Elde edilen verilerin deney grupları arası varyans analizi ANOVA ile istatistiki anlamlılık karşılaştırması ise Student t-testi veya Tukey testi ile yapıldı. İstatistiki anlamlılık sınır değeri olarak $p < 0,05$ alındı. Glutamat reseptör alt birimlerinin ekspresyonunun araştırıldığı ikili immünofloresan işaretli kesitlerde, ilgili reseptör proteinin nesfatin-1 ile kolokalize olup olmadığı belirlendi.

4. BULGULAR

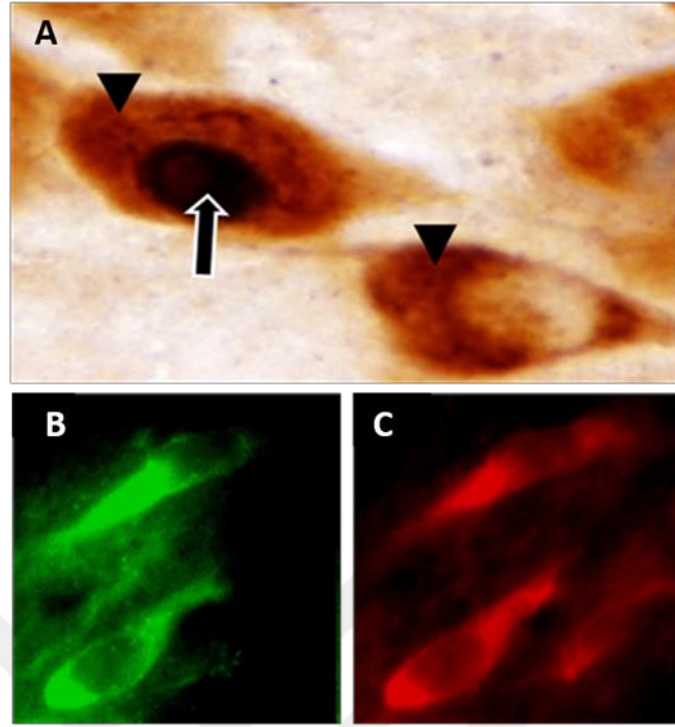
4.1. İmmünohistokimyasal İşaretlemelerin Değerlendirilmesi

İmmünohistokimya tekniği kullanılarak yapılan ikili immün işaretlemelerde, sitoplazmada eksprese olduğu bilinen nesfatin-1 proteini diaminobenzidin (DAB) kromojeni kullanılarak renklendirildi ve oluşturulan komplekse (antijen-antikor-enzim-substrat) ait sinyaller ışık mikroskopunda kahverengi olarak belirlendi (Şekil 8A). Nikel amonyum sülfat ile zenginleştirilmiş DAB (Ni-DAB) uygulamasıyla da çekirdekte lokalize proteinler (c-Fos, pCREB ve pSTAT5) oluşan immünreaksiyon sinyali görünür hale getirildi. Işık mikroskopunda bu reaksiyonun sonucu, koyu maviden siyaha değişen renk tonlarında izlendi (Şekil 8A). Hem çekirdeğinde (kahverengi boyanma) hem de sitoplazmasında (koyu mavi-siyah boyanma) işaretlenme olan nöronlar ikili işaretlenmiş olarak kabul edildi.

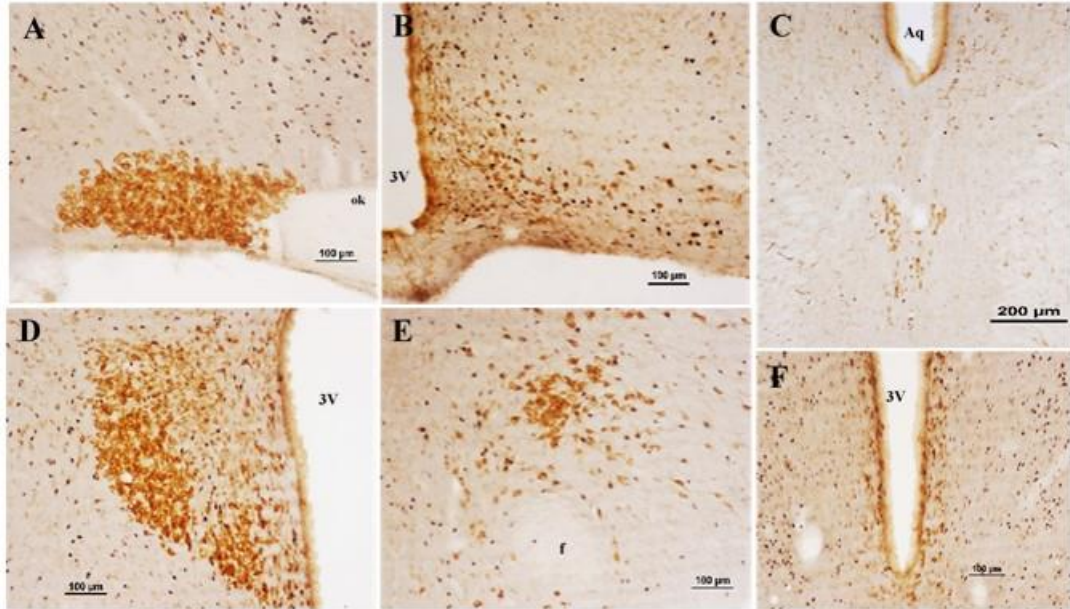
İkili immünofloresan işaretlemelerde, yeşil renkte sinyal veren florokromlarla (Alexa Fluor 488) nesfatin-1 proteinini eksprese eden nöronlar işaretlenirken, kırmızı renkte sinyal veren florokromlarla (Alexa Fluor 594 veya Streptavidin-konjuge Texas Red) glutamat reseptör alt birim proteinlerini içeren nöronlar işaretlendi (Şekil 8B ve C).

4.2. Nesfatin-1 Nöronlarının Hipotalamustaki Lokalizasyonu

Nesfatin-1'i içeren nöronların hipotalamustaki lokalizasyonlarının literatürle uyumlu olduğu belirlendi. Bu nöronların hipotalamusun supraoptik çekirdek (SON), arkuat çekirdek (ARC), paraventriküler çekirdek (PVN), Edinger-Westphal çekirdek (EW), lateral hipotalamik alan (LHA) ile periventriküler çekirdekte (PeV) lokalize nöronlarca sentezlendiği immünohistokimyasal olarak gösterildi (Şekil 9).



Şekil 8. İmmünohistokimyasal işaretlemelerin genel sonuçları. (A) İkili indirekt immünoperoksidaz işaretleme tekniğinde, nesfatin-1 nöronları kahverengi sitoplazmik boyanma (▲) ile çekirdekte eksprese edilen transkripsiyon faktörleri de siyah çekirdek (▲) boyanması ile ayırt edilmektedir. (B) Yeşil florokrom ile işaretli nesfatin-1 nöronu. (C) Kırmızı florokrom ile işaretli glutamat reseptör alt birim proteini.



Şekil 9. Nesfatin-1-pozitif nöronların dişi sıçan hipotalamik çekirdeklerdeki dağılımı. (A) Supraoptik çekirdek, (B) Arkuat çekirdek, (C) Edinger-Westphal çekirdek, (D) Paraventriküler çekirdek, (E) Lateral hipotalamik alan ile (F) Periventriküler çekirdekte lokalize nesfatin-1 immünreaktivitesi gösteren nöronlar ayırt edilmektedir. 3V: üçüncü ventrikül, ok: optik kiazma, Aq: Akvaduktus serebri, f: forniks.

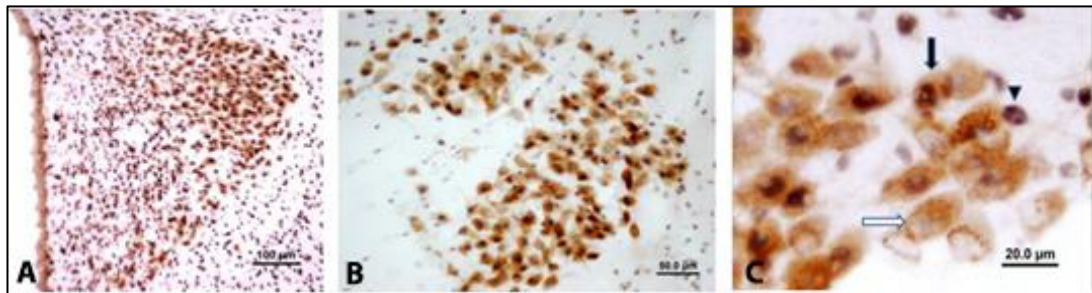
4.3. Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün belirlenmesi

4.3.1. Farklı glutamat agonistlerinin (KA, AMPA ve NMDA) nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisi

Nesfatin-1 nöronlarının glutamaterjik düzenleniminin belirlenmesi amacıyla hücre içi nöronal aktivasyon belirteçleri olan c-Fos, pCREB ve pSTAT5 proteinlerinin nesfatin-1 ile olan ko-ekspresyonu ikili immünohistokimyasal işaretleme tekniği ile araştırıldı. Bu çalışmalarda hipotalamik supraoptik çekirdek, arkuat çekirdek ve paraventricüler çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları istatistiksel olarak değerlendirildi. Glutamatın non-NMDA reseptör agonistleri olan kainik asit ve AMPA enjeksiyonları ile NMDA enjeksiyonunun etkileri nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonu açısından değerlendirildi.

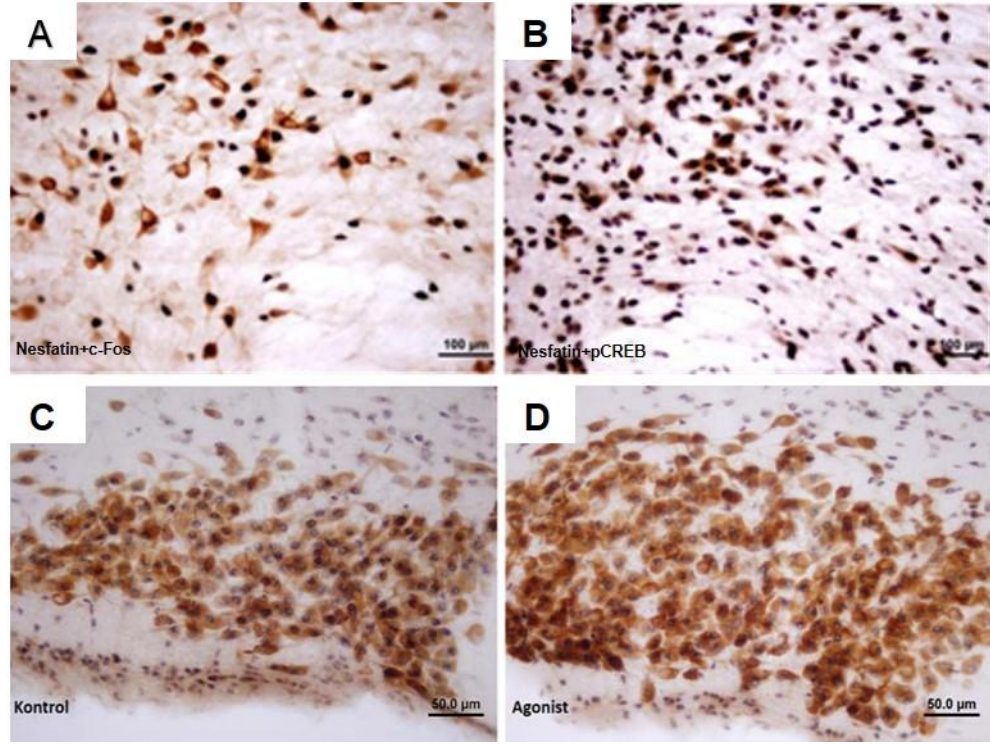
4.3.1.1. Glutamat agonistleri ile uyarılan nesfatin-1 nöronlarında phospho CREB'in ekspresyonu

pCREB ekspresyonunun mikroskopik analizlerine bakıldığında, deneklere uygulanan glutamat agonistlerinin hipotalamik paraventricüler çekirdekte ve supraoptik çekirdekte lokalize çok sayıda nesfatin-1 nöronunda pCREB ekspresyonunu indüklediği görüldü (Şekil 10).



Şekil 10. Nesfatin-1 nöronlarındaki pCREB ekspresyonu (A) Hipotalamik paraventricüler çekirdek, (B) Hipotalamik supraoptik çekirdek, (C) Siyah ok (↓): pCREB-pozitif-nesfatin-1 nöronunu, Beyaz ok (⇩): pCREB-negatif-nesfatin-1 nöronunu, Ok başı (▼): pCREB-pozitif nesfatin-1-negatif bir nöronu göstermekte.

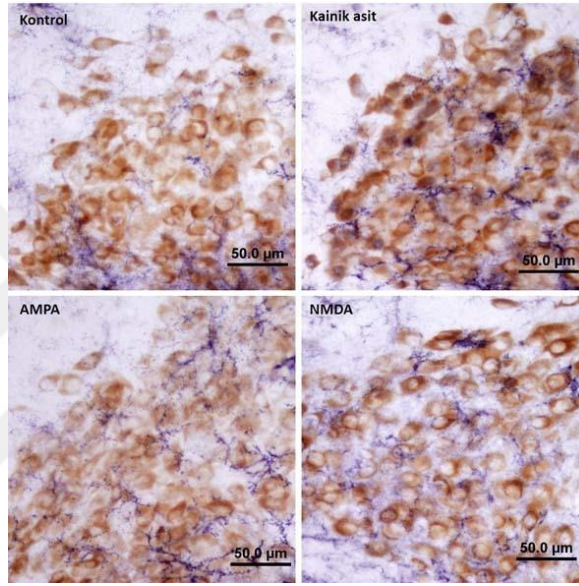
Özellikle perifornikal lateral hipotalamus bölgesinde yer alan nesfatin-1 nöronlarında agonist uygulamasının (kainik asit enjeksiyonu sonrasında) c-Fos ekspresyonuna göre çok daha fazla nöronda pCREB ekspresyonuna yol açtığı gözlemlendi (Şekil 11A ve B). Ayrıca SON'de yerleşik olan hemen hemen tüm nesfatin-1 nöronlarının, kontrol ve enjeksiyon gruplarında pCREB'i eksprese etmeleri nedeniyle agonist uygulamalarının etkisi değerlendirilemedi. Bu bölgede lokalize tüm nöronların pCREB-pozitif olduğu görülmektedir (Şekil 11C ve D).



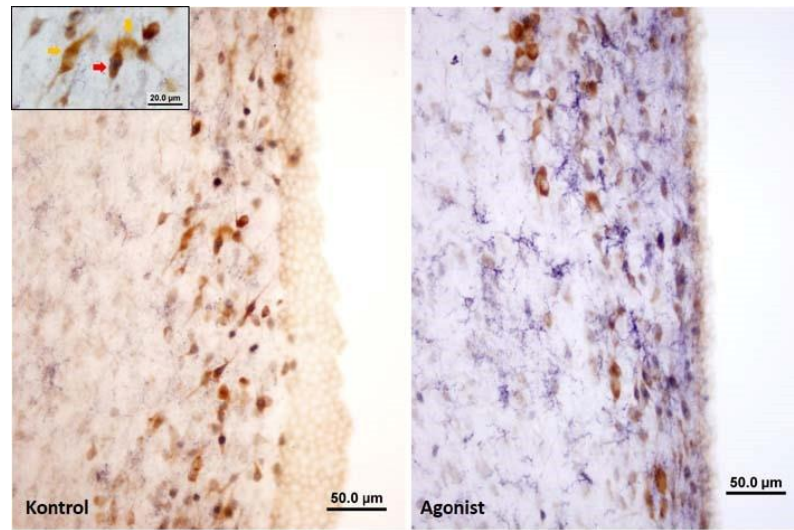
Şekil 11. Agonist uygulamasının perifornikal alan ve SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarına etkisi. (A-B) Agonist uygulaması sonrası perifornikal alanda yerleşik nesfatin-1 nöronlarında görülen c-Fos ve pCREB ekspresyonları ile (C-D) SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarındaki pCREB ekspresyonu.

4.3.1.2. Glutamat agonistleri ile uyarılan nesfatin-1 nöronlarında pSTAT5'in ekspresyonu

Agonist enjeksiyonu yapılan deneklerde fosforile-STAT5 ekspresyonu değerlendirildiğinde, ne kontrol grubunda ne de enjeksiyonlu gruplarda SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında pSTAT5 immünoaktivitesine rastlanmadı (Şekil 12). pSTAT5'i eksprese eden nesfatin-1 nöronlarına sadece hipotalamik periventriküler çekirdekte rastlanmıştır ancak gruplar arasında bir farklılık belirlenememesi nedeniyle istatistiki değerlendirme yapılmamıştır (Şekil 13).



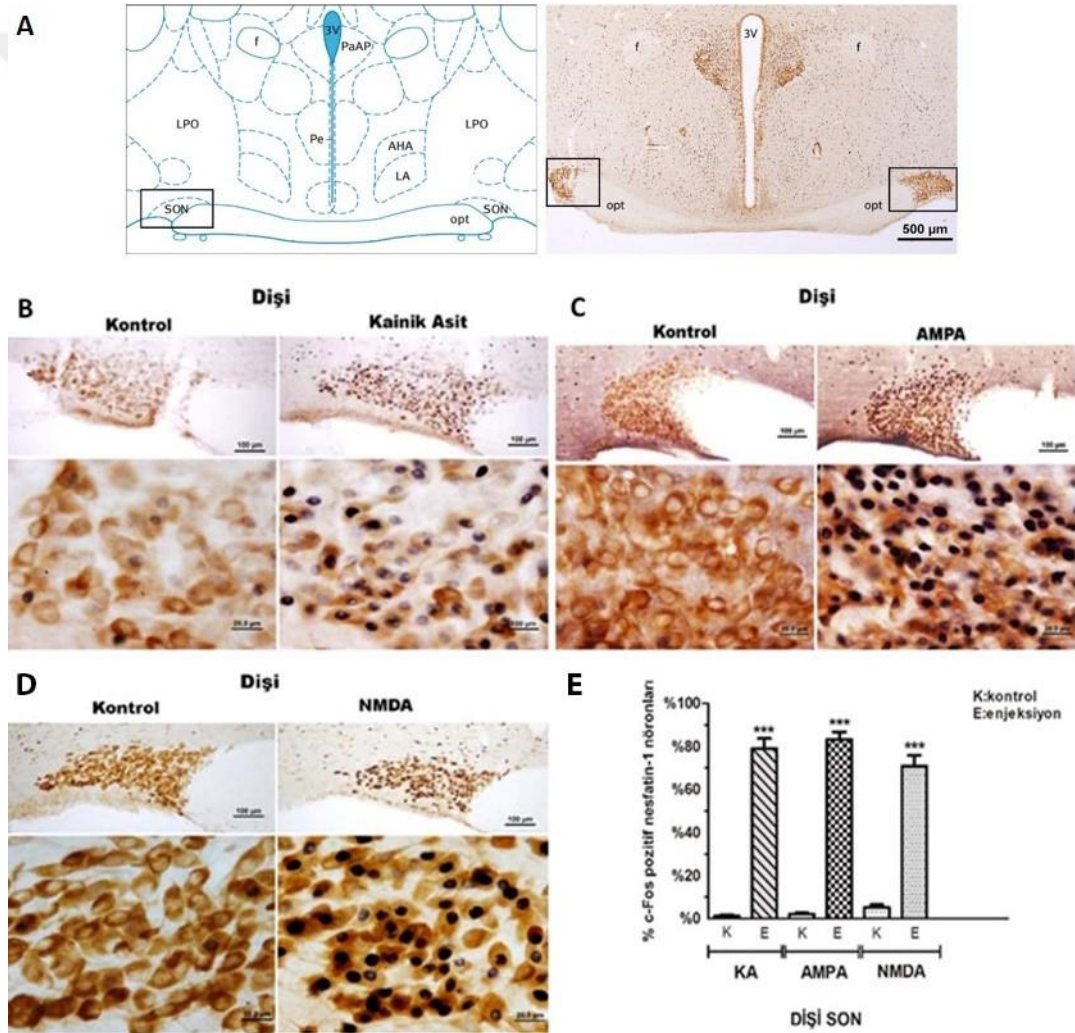
Şekil 12. Agonist uygulamasının SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki fosforile-STAT5 ekspresyonuna etkisi. Herhangi bir nesfatin-1-pozitif nöronda pSTAT5 ekspresyonu görülmemekte.



Şekil 13. Agonist uygulamasının periventriküler çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarındaki pSTAT5 ekspresyonuna etkisi. Küçük fotoğraf: Sarı ok (➔) pSTAT5-negatif nesfatin-1 nöronu, Kırmızı ok (➔) pSTAT5-pozitif nesfatin-1 nöronunu göstermektedir.

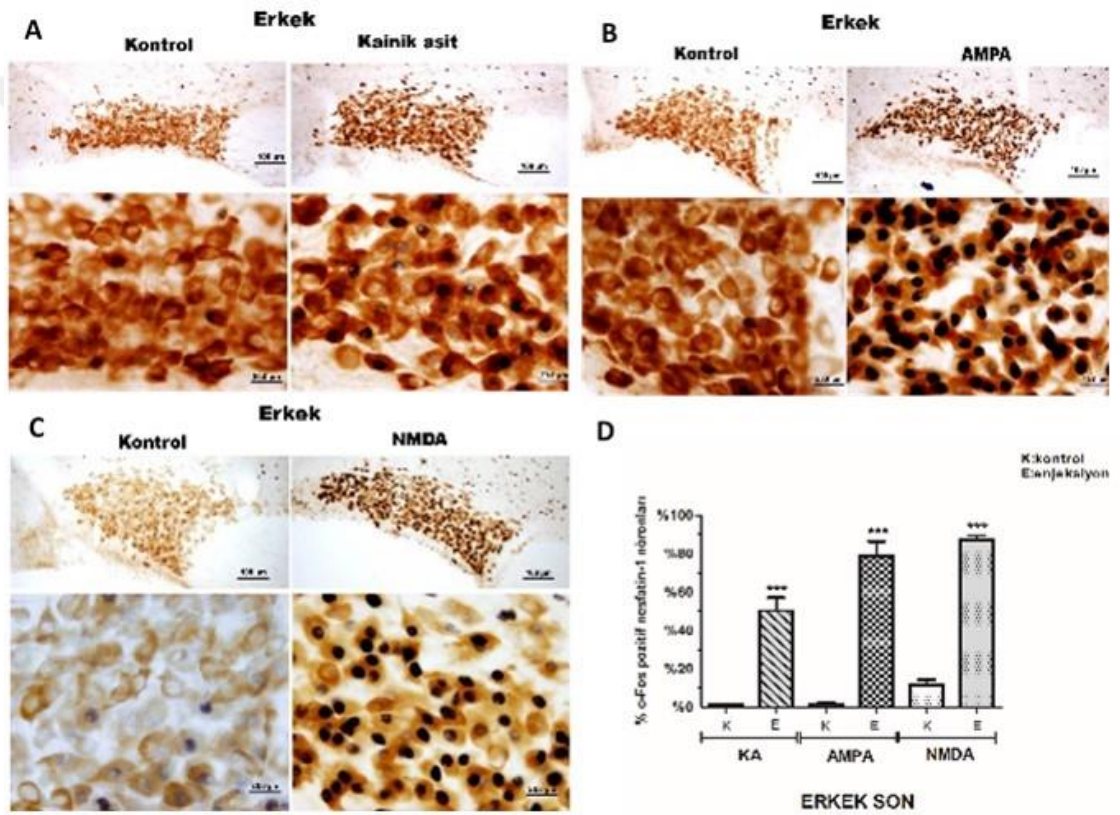
4.3.1.3. Glutamat agonistleri ile uyarılan SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos'un ekspresyonu

Dişi deneklerde, supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının yaklaşık $79,03 \pm 4,70$ 'i kainik asit enjeksiyonu sonrası c-Fos'u eksprese ederken bu oran AMPA enjeksiyonu sonrası $83,27 \pm 3,37$ ve NMDA enjeksiyonu sonrası $70,83 \pm 5,06$ olarak belirlendi (Şekil 14A-D). Kontrol gruplarıyla (KA: $1,20 \pm 0,58$, AMPA: $2,00 \pm 0,69$, NMDA: $5,13 \pm 1,33$) karşılaştırılarak yapılan istatistiki değerlendirme, her üç agonistin de anlamlı olarak nesfatin-1 nöronlarını aktive ettiğini gösterdi (Şekil 14E), ($***p < 0,001$).



Şekil 14. Dişi deneklerde, agonist uygulaması ile aktive olmuş SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının görünümü. (A) Paxinos ve Watson sıçan atlasına göre SON'in lokalizasyonu. (B) Kainik asit, (C) AMPA ve (D) NMDA uygulamalarının SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisi izlenmektedir. Aktive olan nesfatin-1 nöronları c-Fos-pozitif çekirdeklerin varlığı ile ayırt edilmektedir. (E) Agonistlerin nesfatin-1 nöronlarına etkisinin grafiksel gösterimi. Agonist verilen deneklerde c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi istatistiki anlamı olan bir artma göstermiştir ($***p < 0,001$), (SON: Supraoptik çekirdek).

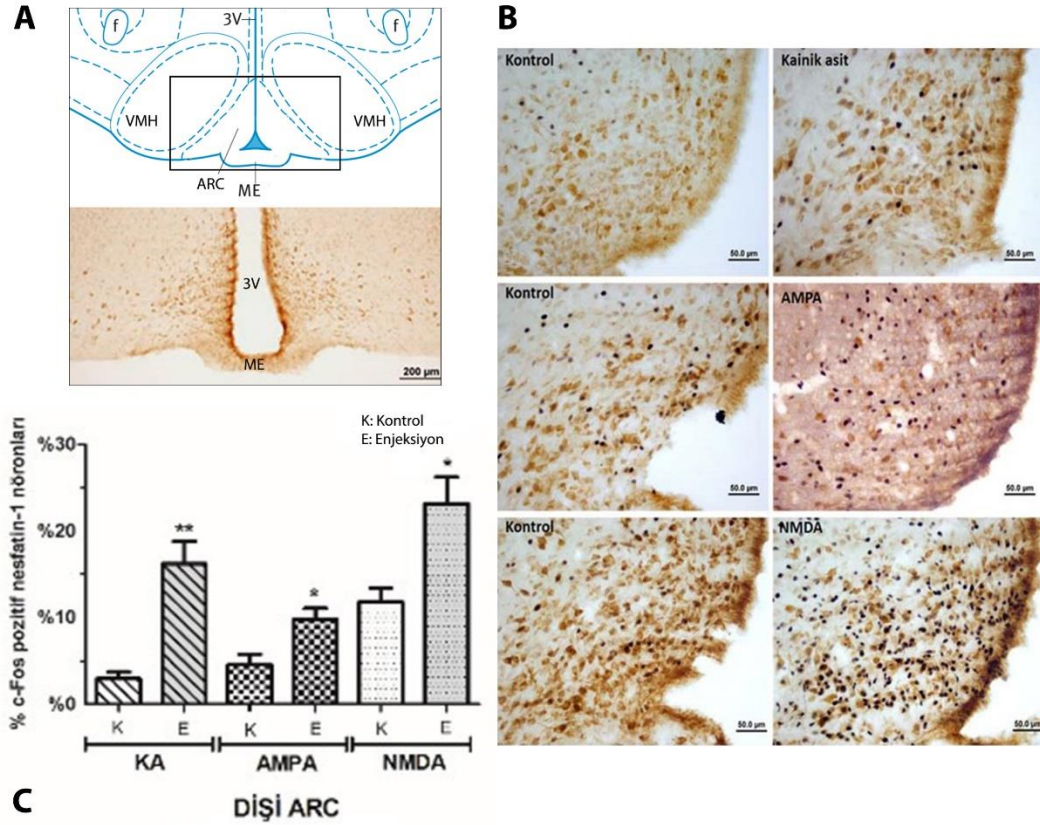
Erkek deneklerde ise kainik asit uygulaması, supraoptik çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının yaklaşık %50,18±6,89’unda c-Fos proteinini eksprese ederken AMPA uygulanan deneklerde bu oran %78,85±7,55 olarak bulundu. NMDA enjeksiyonunun ise SON’deki yaklaşık %87,26±2,11 nöronu aktive ettiği belirlendi (Şekil 15A, B ve C). Kontrol gruplarıyla (KA: %1,47±0,40, AMPA: %1,56±0,69, NMDA: %11,65±2,66) yapılan kıyaslamada elde edilen sonuçların istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (Şekil 15D), (***) $p < 0.001$).



Şekil 15. Erkek deneklerde, agonist uygulaması ile aktive olmuş SON’de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının görünümü. Aktive olan nesfatin-1 nöronları c-Fos-pozitif çekirdeklerin varlığı ile ayırt edilmektedir. (A) Kainik asit, (B) AMPA ve (C) NMDA uygulamalarının SON’de lokalize nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisi izlenmektedir. (D) Agonistlerin nesfatin-1 nöronlarına etkisinin grafiksel gösterimi. Agonist verilen deneklerde c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi istatistiki anlamı olan bir artma göstermiştir (***) $p < 0.001$), (SON: Supraoptik çekirdek).

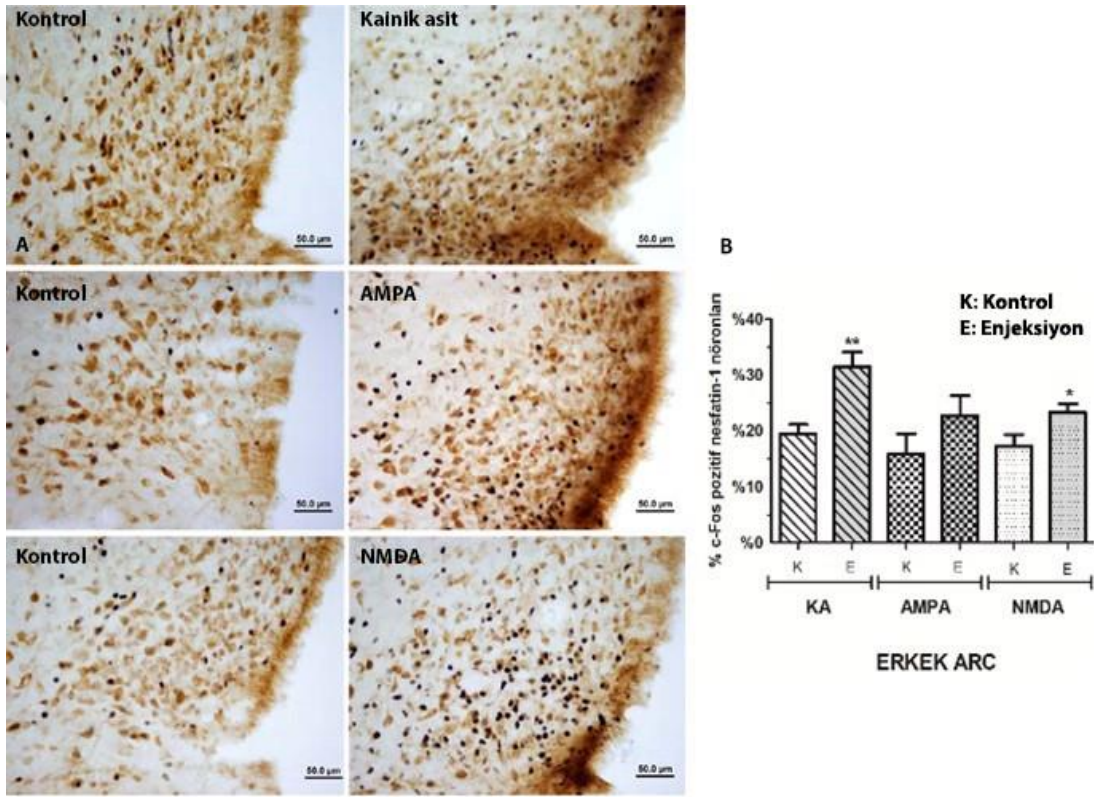
4.3.1.4. Glutamat agonistleri ile uyarılan ARC'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos'un ekspresyonu

Dişi deneklerde arkuat çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları incelendiğinde, kainik asitin $16,20 \pm 2,60$, AMPA'nın $9,78 \pm 1,28$ ve NMDA'nın $23,15 \pm 3,05$ oranında nesfatin-1 nöronunu aktive ettiği belirlendi (Şekil 16B). Bu oran kontrol gruplarında, KA için $2,92 \pm 0,79$, AMPA için $4,56 \pm 1,19$, NMDA için $11,79 \pm 1,59$ olarak belirlendi. Dişi deneklerin arkuat çekirdeklerinde, glutamat agonistlerinin istatistiki olarak anlamlı bir şekilde nesfatin-1 nöronlarında c-Fos ekspresyonunu tetiklediği görüldü (Şekil 16C).



Şekil 16. Dişi deneklerde ARC'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi. (A) Agonist enjekte edilen deneklerde kontrol gruplarına göre c-Fos-immünoreaktif nesfatin-1 nöronlarının sayısının arttığı gözlenmektedir. (B) Verilerin analizi agonist gruplarındaki aktive olmuş nöron sayısındaki artışın anlamlı olduğunu göstermektedir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (ARC: Arkuat çekirdek, ME: Median eminens, f: Forniks, 3V: 3. ventrikül, VMH: Ventromedial hipotalamik çekirdek)

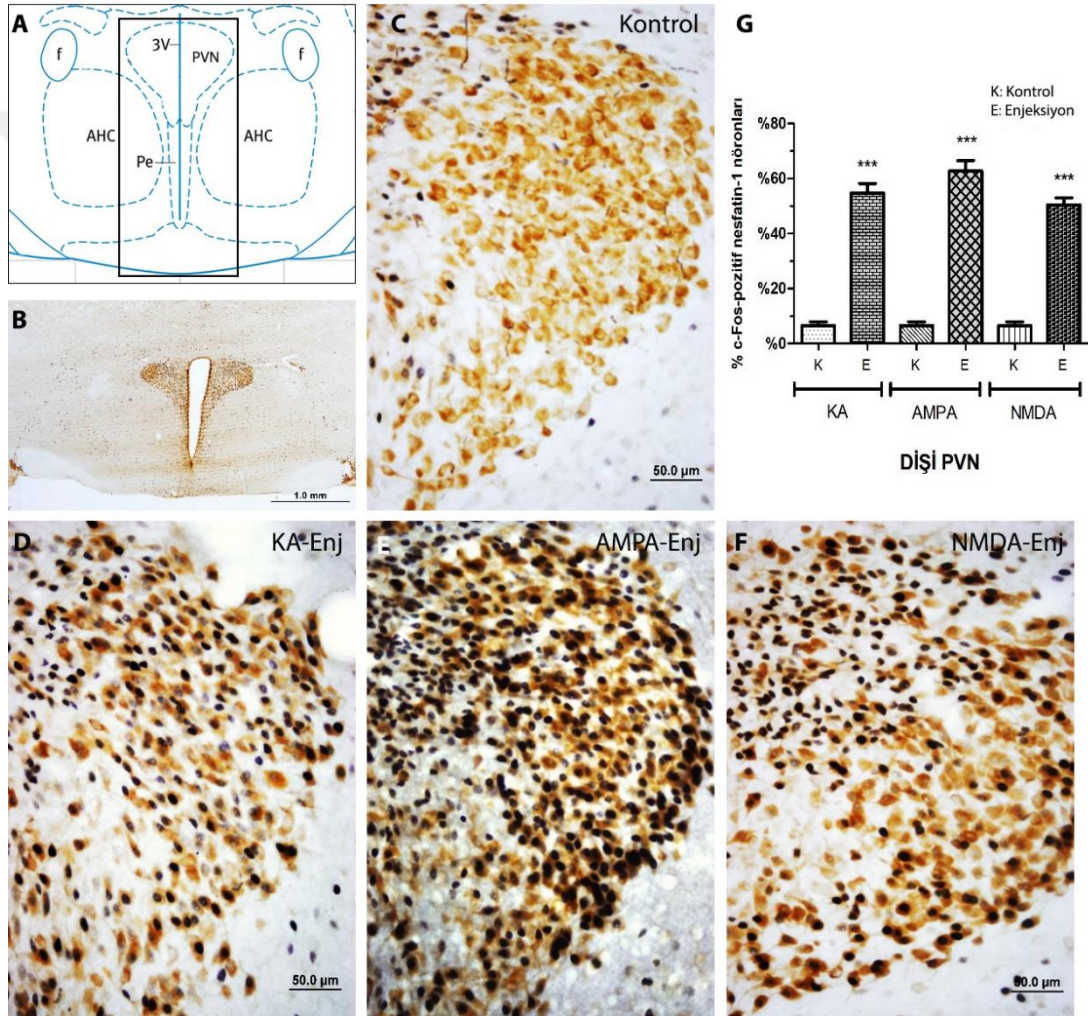
Erkek sıçanlarda kainik asit etkisiyle arkuat çekirdek nesfatin-1 nöronlarının $31,54 \pm 2,56$ 'sı, AMPA enjeksiyonu sonrası $22,72 \pm 3,59$ 'u ve NMDA verilmesini takiben yaklaşık $23,34 \pm 1,55$ 'i c-Fos-pozitif olarak izlendi. Kontrol deneklerde bu yüzdeler sırasıyla $19,53 \pm 1,61$, $15,90 \pm 3,62$ ve $17,29 \pm 2,05$ olarak belirlendi. Yapılan istatistiki analizler sonucunda kainik asit ve NMDA etkilerinin anlamlı olduğu bulundu. AMPA etkisiyle c-Fos'u eksprese eden nesfatin-1 nöronu yüzdesi artmış olmasına rağmen bu artışın istatistiki anlamlılığa ulaşamadığı görüldü (Şekil 17).



Şekil 17. Erkek deneklerde ARC'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi. (A) Agonist enjekte edilen deneklerde kontrol gruplarına göre c-Fos-immünoreaktif nesfatin-1 nöronlarının sayısının arttığı gözlenmektedir. (B) Verilerin analizi kainik asit ve NMDA uygulamasının neden olduğu aktive olmuş nöron sayısındaki artışın anlamlı, AMPA uygulamasının ise etkisiz olduğunu göstermektedir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

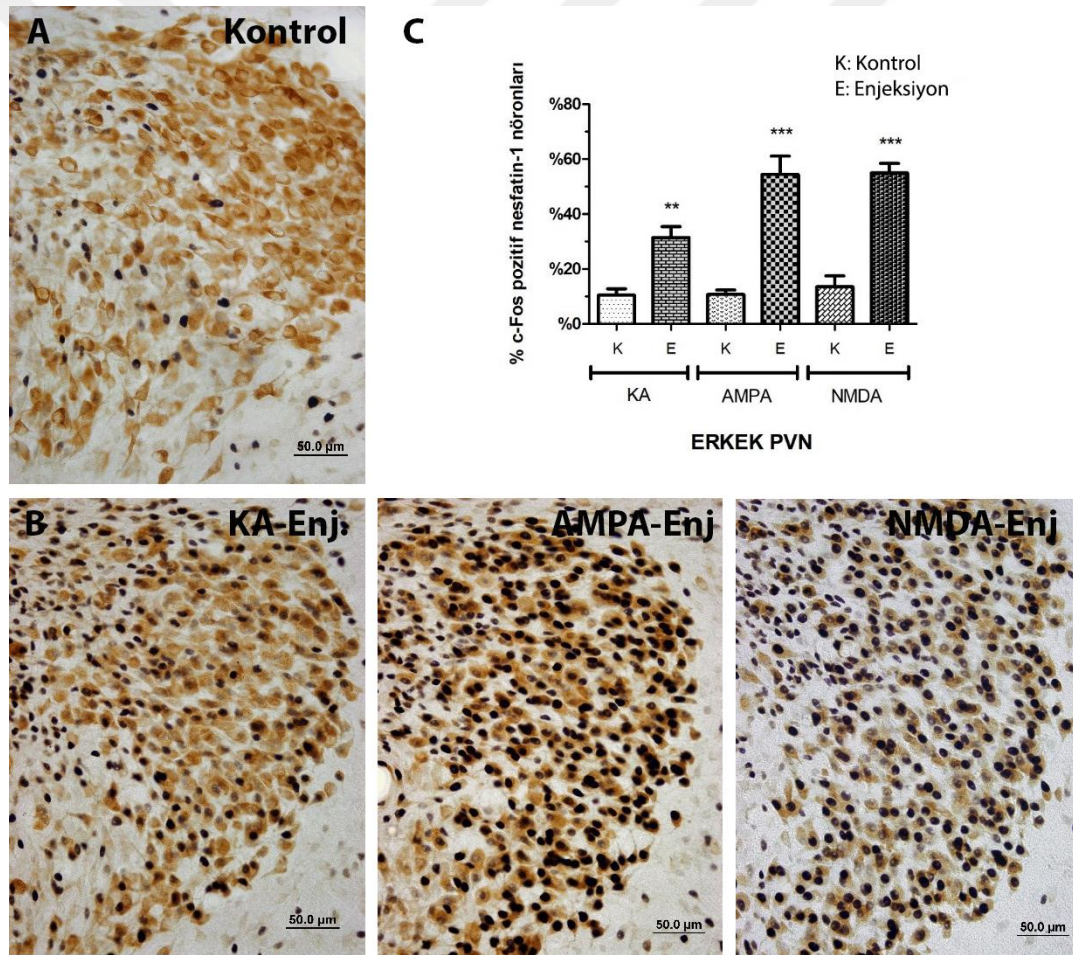
4.3.1.5. Glutamat agonistleri ile uyarılan PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında c-Fos'un ekspresyonu

Dişi deneklerde, kainik asit enjeksiyonu sonrası PVN'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının yaklaşık $54,74 \pm 3,51$ 'i c-Fos'u eksprese ederken bu oran AMPA enjeksiyonu sonrası $62,79 \pm 3,74$ ve NMDA enjeksiyonu sonrası $50,50 \pm 2,52$ olarak belirlendi (Şekil 18D, E ve F). Aktive nöron sayıları kontrol deneklerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu görüldü (Şekil 18C ve G), ($*** p < 0.001$).



Şekil 18. Dişi deneklerde PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi. (A-B) Paxinos ve Watson sıçan atlasına göre PVN'in lokalizasyonu. Dişi deneklerde, kontrol (salin) (C) ve agonist (D, E, F) uygulamalarının PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisi izlenmekte. (G) Agonistlerin nesfatin-1 nöronlarına etkisinin grafiksel gösterimi. Agonist verilen deneklerde c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı bir artışa göstermiştir ($***p < 0.001$), (PVN: Paraventriküler çekirdek)

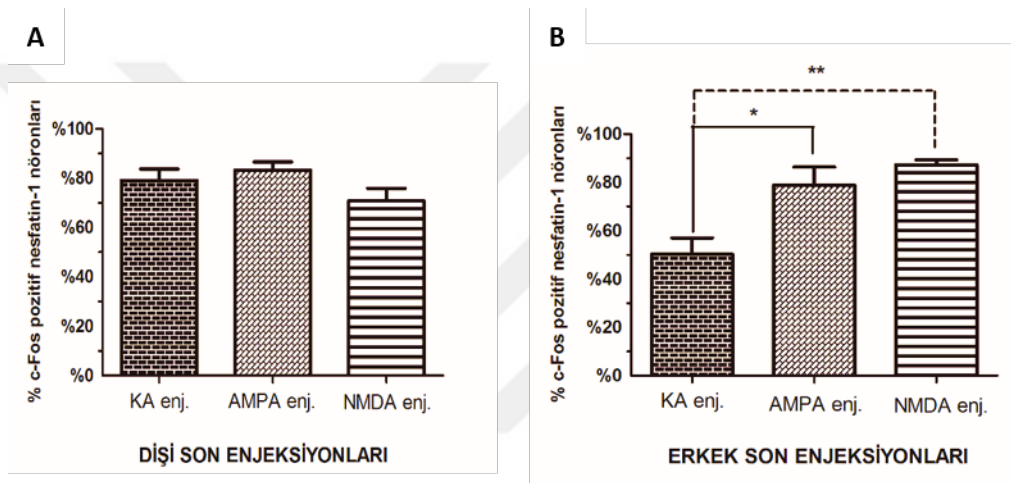
Erkek sıçanlarda, kainik asit etkisiyle paraventriküler çekirdek nesfatin-1 nöronlarının $31,41 \pm 4,05$ 'i c-Fos'u eksprese ederken, bu oran kontrol gruplarında $10,44 \pm 2,33$ olarak belirlendi. AMPA enjeksiyonunun c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının oranını $10,67 \pm 1,71$ 'den $54,44 \pm 6,65$ 'e yükselttiği; NMDA enjeksiyonu sonrasında ise yaklaşık $54,96 \pm 3,47$ c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronunun olduğu belirlendi. NMDA kontrol deneklerinde bu oran $13,49 \pm 4,03$ olarak bulundu. Her üç agonistte gözlenen bu artışların kontrol grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. (Şekil 19).



Şekil 19. Erkek deneklerde PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi. Erkek deneklerde, (A) kontrol (salin) ve (B) agonist (KA, AMPA, NMDA) uygulamalarının PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna etkisi izlenmekte. (C) Agonistlerin nesfatin-1 nöronlarına etkisinin grafiksel gösterimi. Agonist verilen deneklerde c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöron yüzdesi istatistiksel anlamı olan bir artma göstermiştir (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), (PVN: Paraventriküler çekirdek)

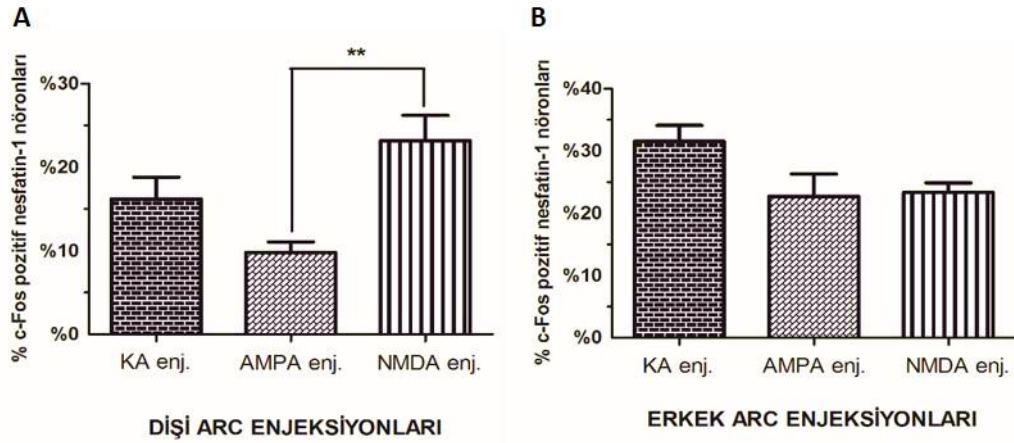
4.3.2. Glutamat agonistlerinin etki düzeylerinin karşılaştırılması

SON: Glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkileri birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiki anlamlılık taşımada, dişi deneklerin supraoptik çekirdeklerinde yerleşik nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunda en etkili agonist olarak AMPA (Şekil 20A), erkek deneklerin SON’de ise NMDA görülmektedir (Şekil 20B). Dişi deneklerde 3 agonist birbirine benzer sayıda nöronu aktive ederken (KA için; %79,03, AMPA için; %83,26, NMDA için; %70,82), erkek deneklerde kainik asitin etkisi (%50,18), AMPA (%78,85) ve NMDA (%87,26)’nın etkilerine göre istatistiki anlam taşıyacak şekilde daha güçsüz bulundu.



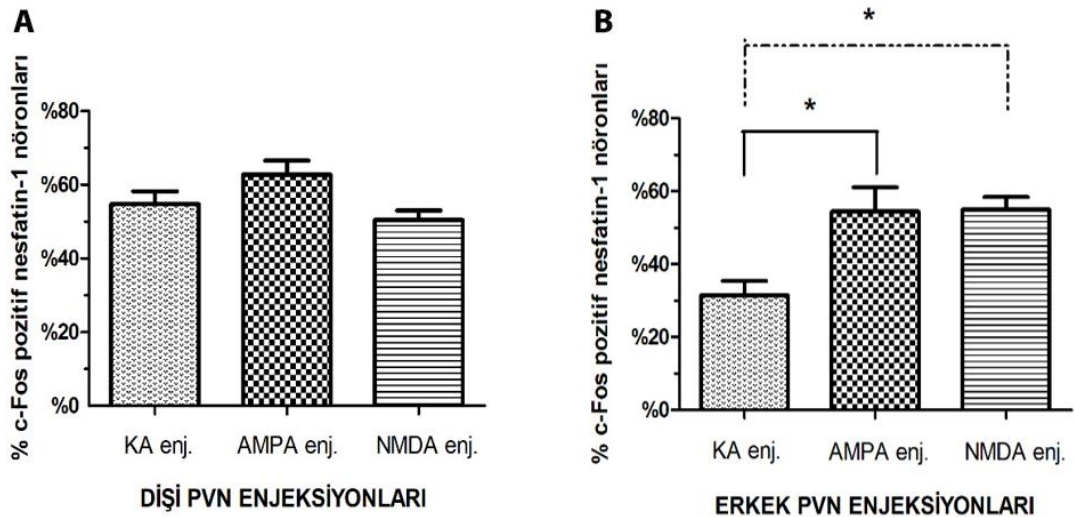
Şekil 20. SON’de glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması. SON’de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunda en etkili glutamat reseptör agonistinin dişi deneklerde AMPA (A), erkek deneklerde ise NMDA (B) olduğu izlenmektedir. Kainik asit, erkek SON’de en güçsüz agonisttir (*p<0.05, **p<0.01).

ARC: Arkuat çekirdekteki glutamat agonistlerinin etkisi SON bulgularından farklılık taşımaktadır. Dişi deneklerde, arkuat çekirdekte lokalize nesfatin-1 nöronlarını en güçlü şekilde uyarın agonist NMDA (%23,15) iken, en güçsüz uyarın SON’de en güçlü uyarını yaratan AMPA (%9,78)’dir. İstatistiksel değerlendirme NMDA enjeksiyonunun AMPA’ya göre daha güçlü bir etki gösterdiğini belirledi (**p<0.01), (Şekil 21A). Erkek deneklerin arkuat çekirdeklerinde bulunan nesfatin-1 nöronlarının agonist enjeksiyonu sonrası ikili işaretlenme yüzdeleri (KA için; %31,54, AMPA için; %22,72, NMDA için; %23,34) istatistiki anlam taşımayacak şekilde birbirine yakındır (Şekil 21B).



Şekil 21. ARC’de glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması. ARC’de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunda en etkili glutamat reseptör agonistinin dişi deneklerde NMDA (A), erkek deneklerde ise kainik asit (B) olduğu izlenmektedir. Dişi deneklerde ARC’de en güçsüz agonist AMPA’dır (A), (**p<0.01).

PVN: Paraventriküler çekirdekteki agonist etkilerine bakıldığında dişi deneklerde kainik asit için %54,73, AMPA için %62,79 ve NMDA için %50,50 oranında yani benzer sayılarda nesfatin-1 nöronu aktive olduğu görüldü (Şekil 22A). Erkek deneklerde ise AMPA (%54,44) ve NMDA (%54,95) etkileri kainik asitin etkisi (%31,41) ile karşılaştırıldığında istatistiki anlam taşıyacak şekilde daha güçlü (p<0,05) bulundu (Şekil 22B).



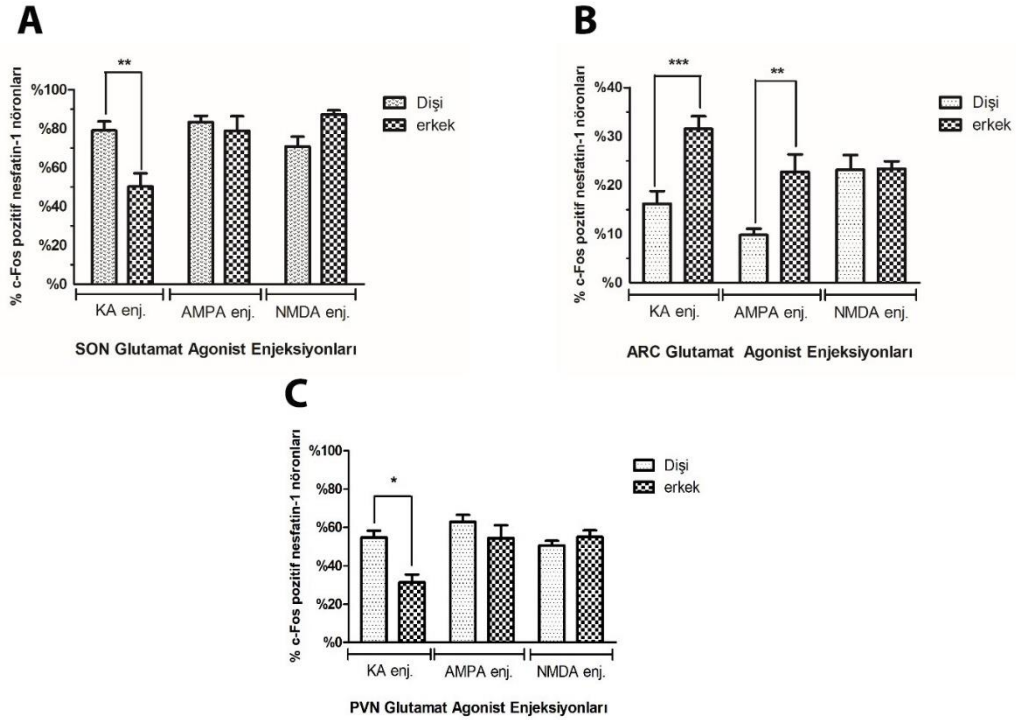
Şekil 22. PVN’de glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması. (A) Dişi deneklere uygulanan agonistler arasında etkileri bakımından herhangi bir farklılık gözlenmezken, (B) erkek deneklerde AMPA ve NMDA’nın kainik asite göre daha etkili olduğu gözlenmektedir, (* p<0.05).

4.3.3. Glutamat agonistlerinin cinsiyete bağı etkilerinin karşılaştırılması

SON: Supraoptik çekirdek nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonu değerlendirildiğinde, kainik asit etkisinin erkek deneklerde dişi deneklere göre anlamlı şekilde daha az olduğu (** $p<0,01$) görüldü. AMPA veya NMDA etkileri ise her iki cinsiyette istatistiki anlam taşımayan minimal farklılıklar gösterdi (Şekil 23A).

ARC: Arkuat çekirdek incelendiğinde, kainik asit ve AMPA enjeksiyonları sonrası erkek deneklere ait nesfatin-1 nöronlarının aktivasyon yüzdelerinin dişilere göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu görüldü. NMDA'nın uyarıcı etkisinin her iki cinsiyette de benzer olduğu belirlendi (Şekil 23B).

PVN: Paraventriküler çekirdekteki glutamat agonist enjeksiyonlarına bakıldığında, sadece kainik asit etkisinin dişi deneklerde erkek deneklere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p<0,05$) belirlendi. AMPA ve NMDA ile aktive olan nesfatin-1 nöronlarının erkek ve dişi bireyler arasındaki farklılığın ise istatistiksel olarak anlamlılık taşımadığı görüldü (Şekil 23C).



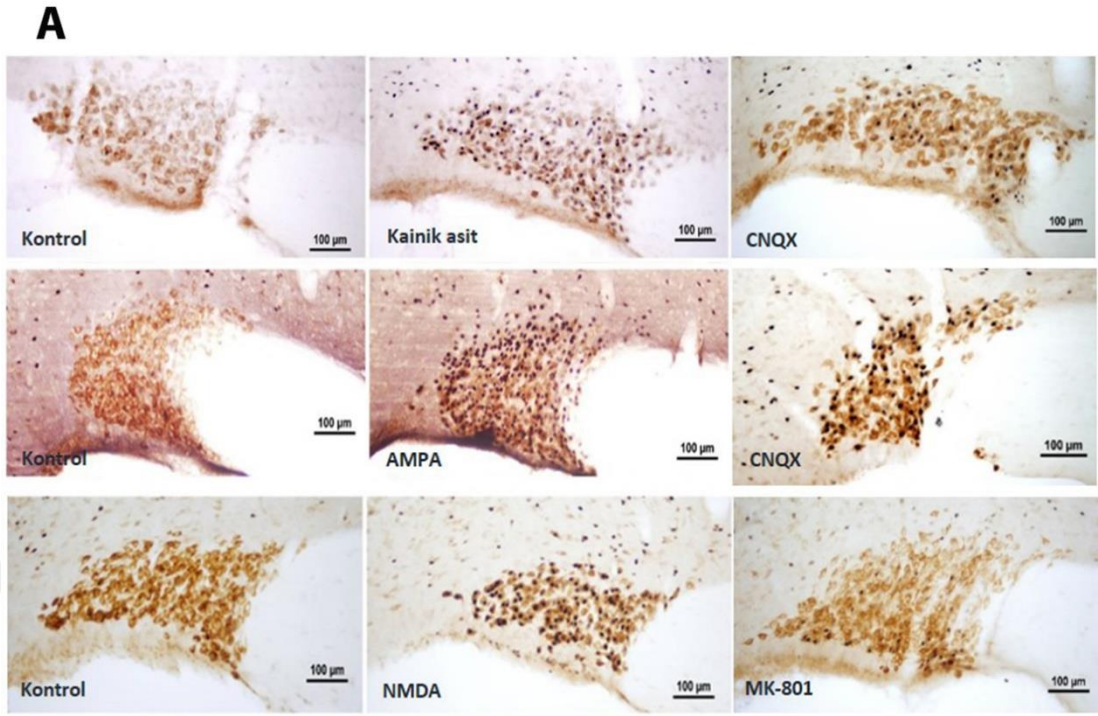
Şekil 23. Cinsiyete göre agonist (Kainik asit, AMPA ve NMDA) etkilerinin karşılaştırılması (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

4.3.4. Nesfatin-1 Nöronlarının Aktivasyonunda Glutamat Antagonistlerinin Etkisi

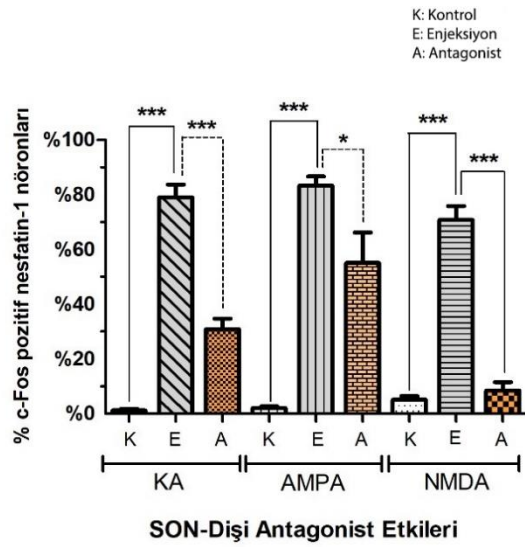
Nesfatin-1 nöronlarının düzenleniminde glutamaterjik sistemin reseptör spesifik etkilerini belirlemek amacıyla deneklere agonist enjeksiyonlarından 15 dakika önce glutamat reseptör antagonistleri CNQX (kainat/AMPA reseptör antagonisti, 2 mg/kg) ile MK801 (NMDA reseptör antagonisti, 1 mg/kg) uygulandı.

SON: Dişi deneklerde, her üç agonistin enjeksiyonlarından önce özgün antagonist uygulanması supraoptik çekirdekte aktive olan nesfatin-1 nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığı belirlendi. Kontrol deneklerde $1,20 \pm 0,58$ civarında olan c-Fos-pozitif nöron sayısı kainik asit enjeksiyonu ile $79,03 \pm 4,70$ 'e yükselirken, non-NMDA reseptör antagonisti CNQX uygulaması bu sayıyı yaklaşık $30,89 \pm 3,80$ 'e gerilettilti. AMPA etkisiyle $2 \pm 0,69$ 'dan $83,27 \pm 3,37$ 'ye çıkan aktive nesfatin-1 nöronu sayısının CNQX etkisiyle $55,06 \pm 11,16$ 'ya indiği görüldü. En etkili blokasyon NMDA reseptörlerinde antagonist etki yapan MK801 ile elde edildi. NMDA enjeksiyonu, kontrol grubunda $5,13 \pm 1,33$ olarak belirlenen ikili işaretlenmiş nesfatin-1 nöron sayısını $70,83 \pm 5,06$ 'ya yükseltirken, MK801 bu etkiyi ileri düzeyde baskılayarak aktif nöron sayısını $8,49 \pm 3,03$ 'e düşürdü (Şekil 24).

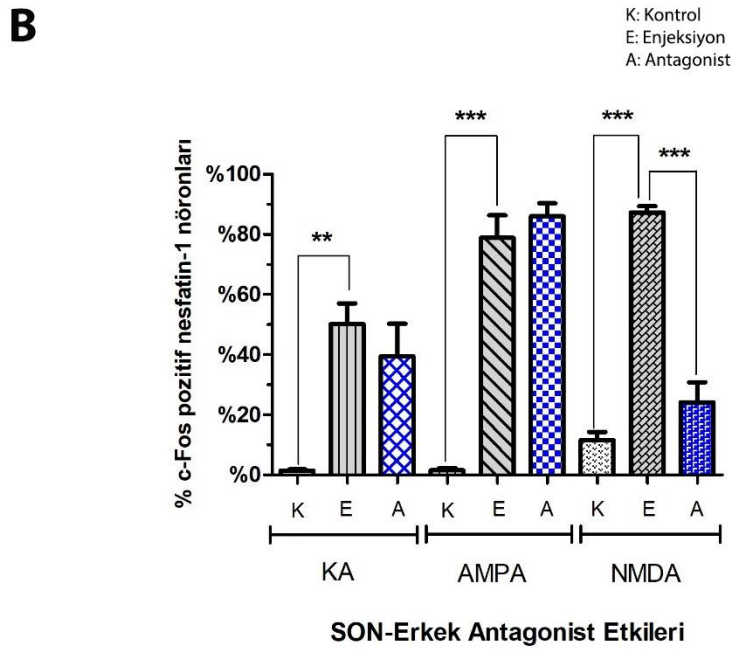
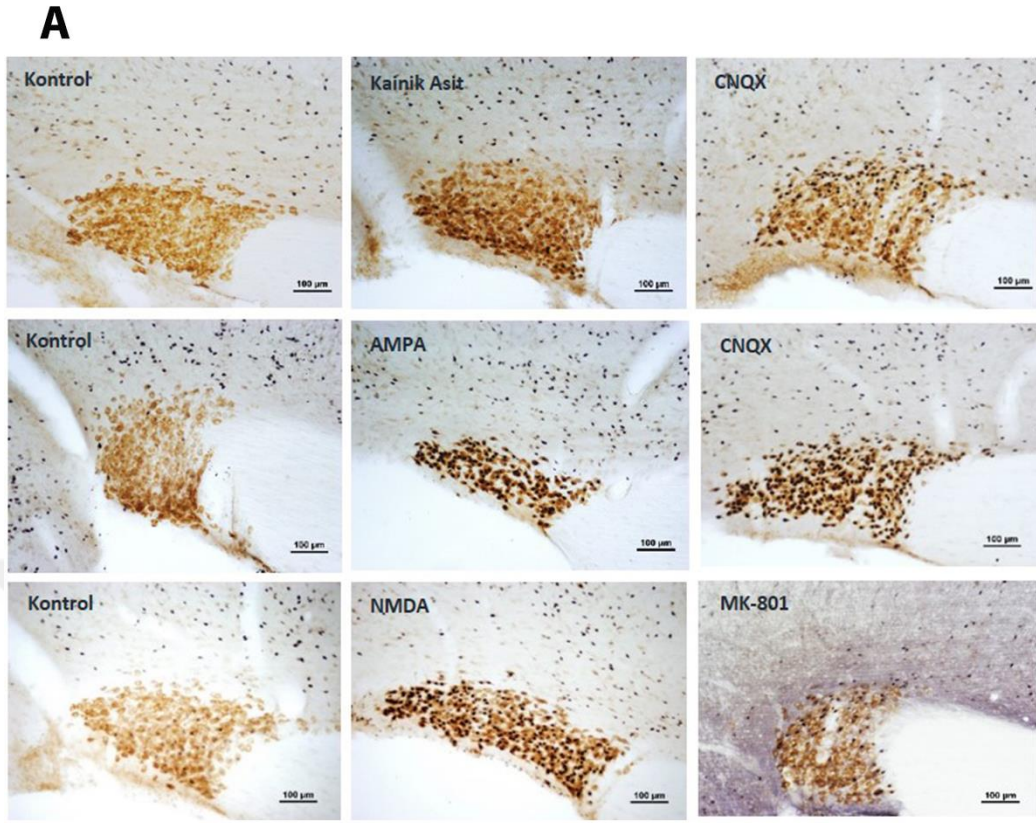
Erkek deneklerde antagonist uygulamasının sadece NMDA enjeksiyonu yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma etkisi sağladığı belirlendi. CNQX enjeksiyonu ne kainik asit ne de AMPA enjeksiyonu yapılan gruplarda anlamlı bir etki göstermedi. Kontrol deneklerinde $1,47 \pm 0,40$ olan c-Fos'u eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının oranı kainik asit enjeksiyonu ile $50,19 \pm 6,89$ 'a yükselirken, CNQX etkisiyle bu oran $39,47 \pm 10,81$ 'lere düşmüştür. AMPA etkisiyle $1,56 \pm 0,69$ 'dan $78,85 \pm 7,55$ 'e çıkan aktive nesfatin-1 nöronu sayısında ise anlamlı bir değişiklik olmamakla beraber $86,03 \pm 4,31$ düzeyine yönelen bir artış izlendi. En etkin blokasyon NMDA reseptörlerinde etki gösteren MK801'de görüldü. NMDA uygulaması, kontrol grubunda $11,65 \pm 2,67$ olarak belirlenen nesfatin-1 nöron sayısını $87,26 \pm 2,11$ 'e yükseltirken, MK801'in bu etkiyi baskılayarak nöron sayısını $24,23 \pm 6,52$ 'ye indirdiği belirlendi (Şekil 25).



B



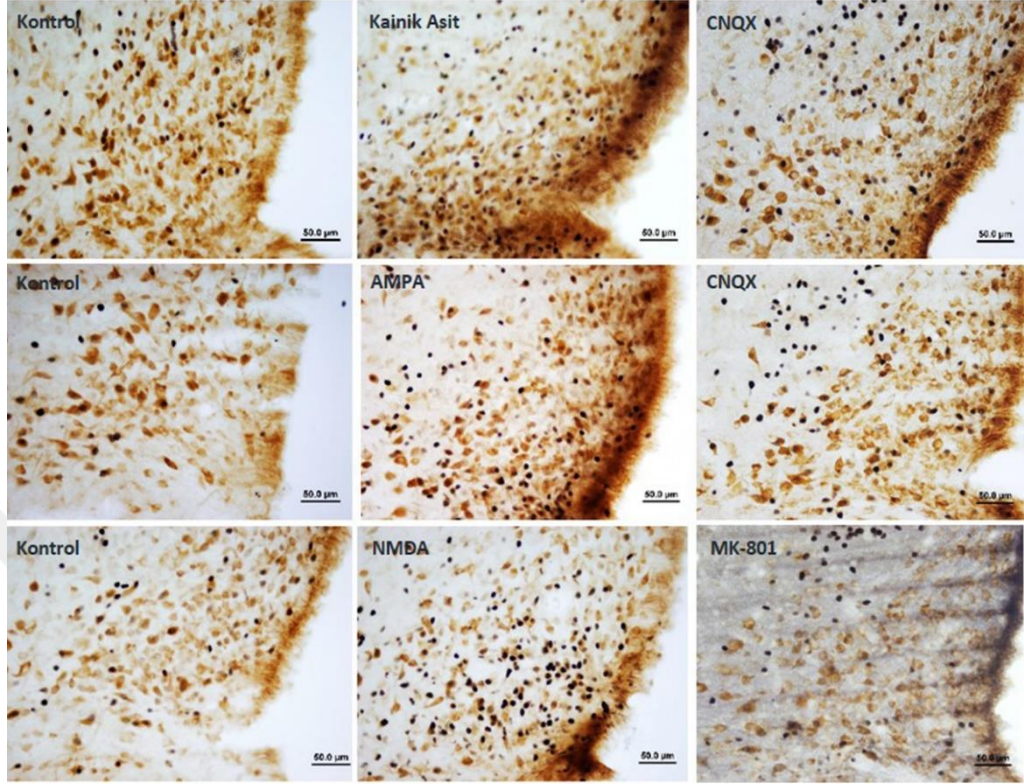
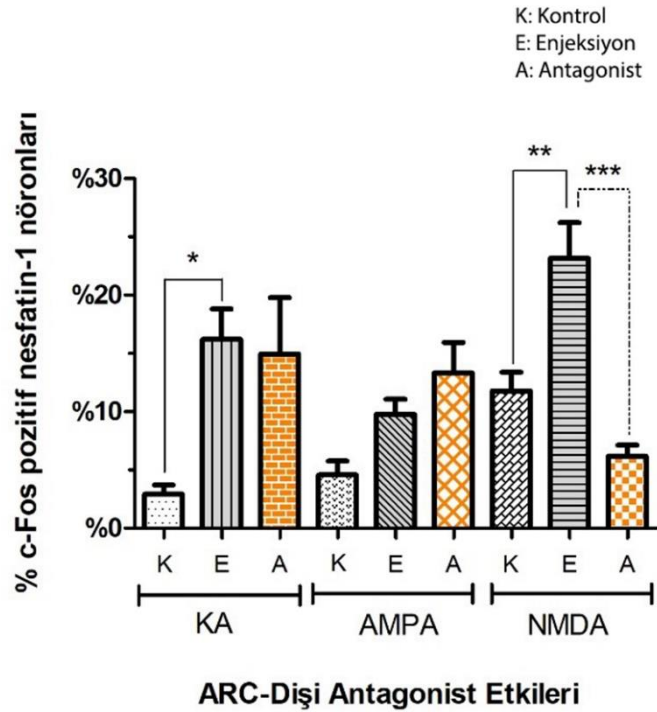
Şekil 24. Dişi deneklerde, SON'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi. **(A)** Fotomikrograflar, deneklere uygun antagonist verilmesinin, agonistlerin enjeksiyonları ile supraoptik çekirdekte aktive edilen nesfatin-1 nöron sayısında azalmaya neden olduğunu göstermektedir. **(B)** Sütun grafik ise aktive olmuş nesfatin-1 nöron sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).



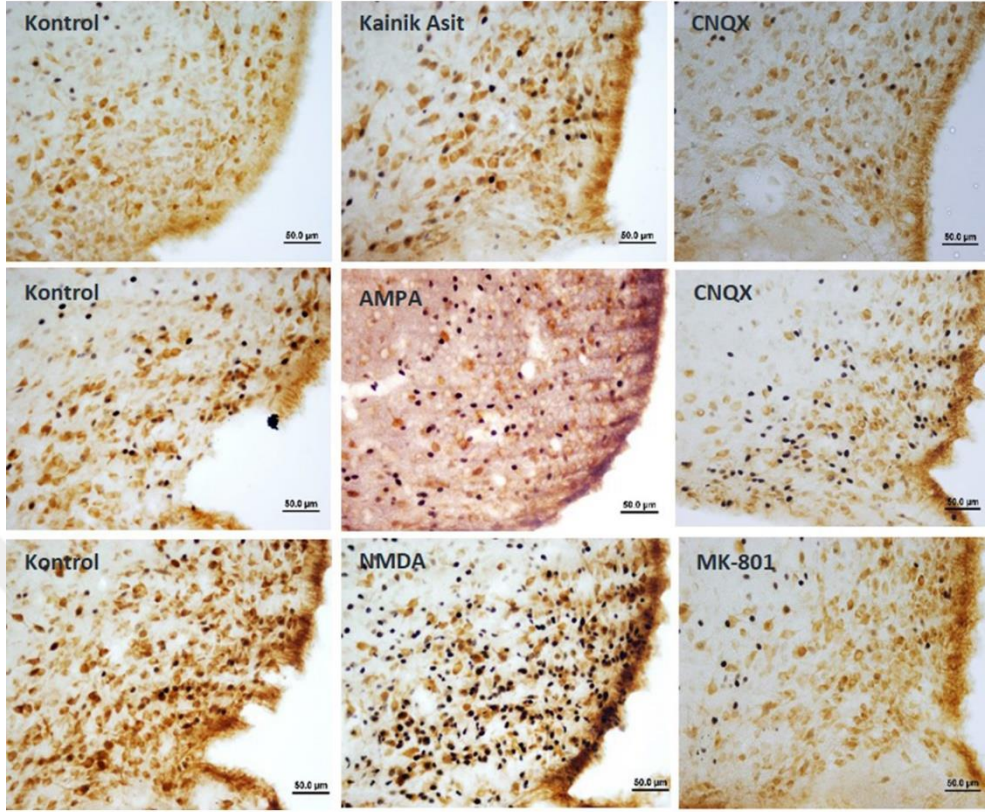
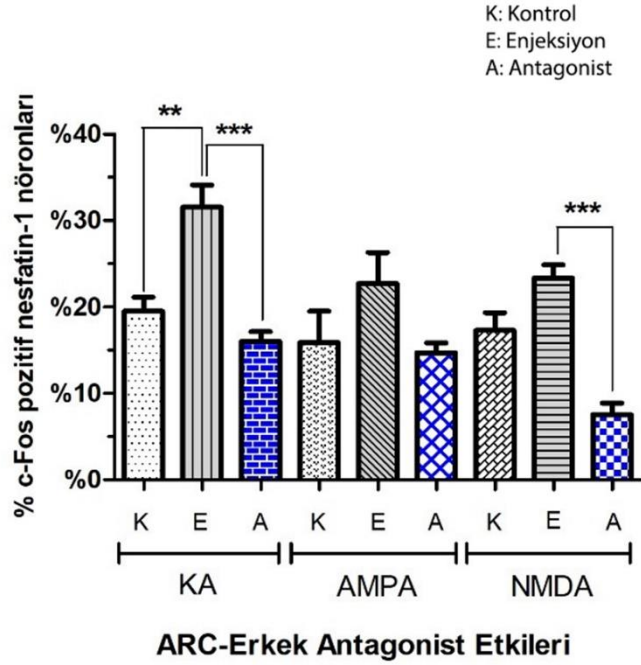
Şekil 25. Erkek deneklerde, SON'deki nefatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi. **(A)** Fotomikrograflar, deneklere uygun antagonist verilmesinin, agonistlerin enjeksiyonları ile supraoptik çekirdekte aktive edilen nefatin-1 nöron sayısında azalmaya neden olduğunu göstermektedir. **(B)** Sütun grafik ise NMDA agonisti ile aktive olmuş nefatin-1 nöron sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir (**p<0.01, ***p<0.001).

ARC: Dişî deneklerin arkuat çekirdeğinde aktive olan nöron sayıları değerlendirildiğinde, özgün antagonist uygulanması sadece NMDA enjeksiyonu yapılan grupta istatistiksel anlamı olan bir azalmaya yol açtığı görüldü. Kontrol deneklerinde $2,92 \pm 0,79$ olan c-Fos'u eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının oranı kainik asit enjeksiyonu ile $16,20 \pm 2,60$ 'a yükselirken, CNQX bu grupta ($14,93 \pm 4,86$) istatistiki anlamlılık taşıyan bir etki göstermedi. AMPA etkisiyle $4,56 \pm 1,19$ 'dan $9,78 \pm 1,28$ 'e ($p > 0,05$) çıkan ve istatistiki olarak anlam ifade etmeyen aktive nesfatin-1 nöronu oranı, CNQX antagonisti uygulaması sonrası $13,32 \pm 2,62$ olarak belirlendi. NMDA enjeksiyonu, kontrol grubunda $11,79 \pm 1,59$ olarak belirlenen nesfatin nöron sayısını anlamlı bir şekilde $23,15 \pm 3,05$ 'e çıkarırken, MK801 bu etkiyi neredeyse tamamen baskılayarak $6,15 \pm 0,98$ 'lere düşürdü (Şekil 26).

Erkek deneklerde ise kainik asit veya NMDA enjeksiyonu yapılan gruplardaki özgün antagonist uygulamalarının, arkuat çekirdeğin nesfatin-1 nöronal aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma sağladığı belirlendi. c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronlarının sayısı kontrol deneklerde $19,53 \pm 1,61$ olarak belirlenirken, kainik asit enjeksiyonu ile bu sayının $31,55 \pm 2,56$ 'ya yükseldiği, CNQX uygulamasının ise artan etkiyi $16,03 \pm 1,11$ 'e geriletlediği görüldü. AMPA uygulaması yapılan grupta görülen aktive nesfatin-1 nöron oranının ($22,72 \pm 3,59$) non-NMDA reseptör antagonisti CNQX'in etkisiyle $14,7 \pm 1,14$ oranına indiği ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlam taşımadığı belirlendi. En etkili blokasyon NMDA reseptörlerinde etki gösteren MK801'de gözlemlendi. NMDA etkisiyle $17,29 \pm 2,05$ 'den $23,34 \pm 1,55$ 'e yükselen aktive nesfatin-1 nöronu oranı MK801'in baskılayıcı etkisi ile $7,53 \pm 1,33$ 'e geriledi (Şekil 27).

A**B**

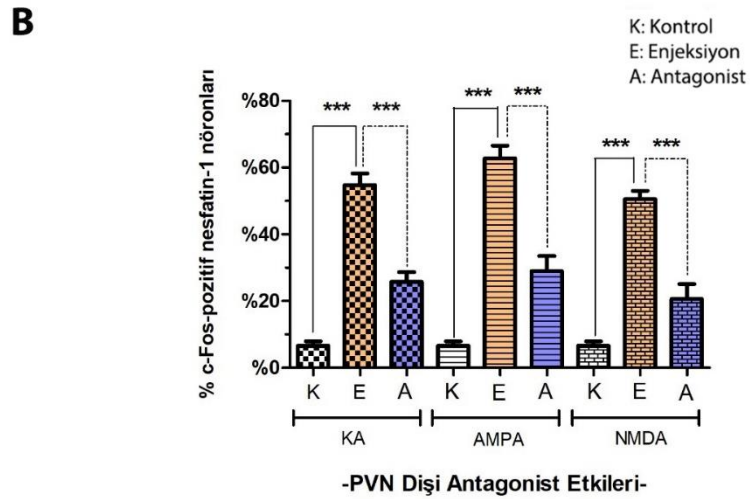
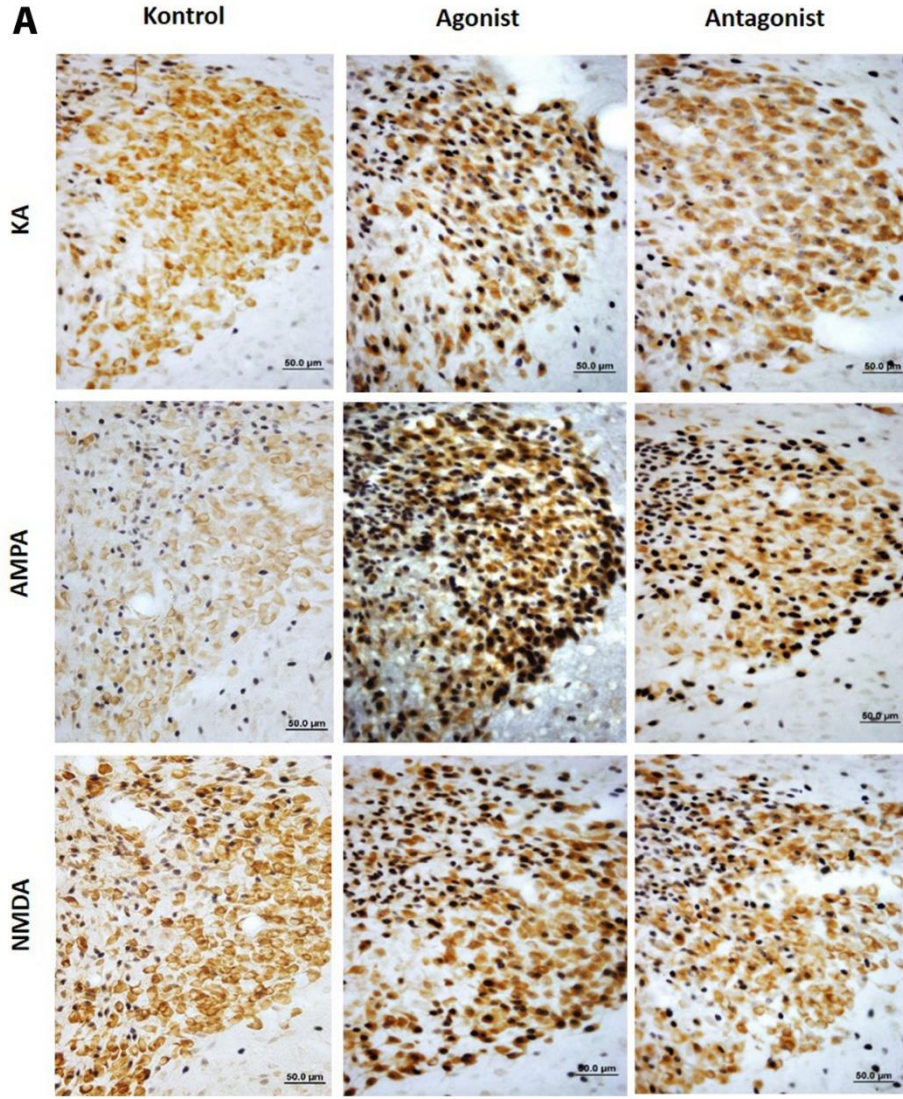
Şekil 26. Dişi deneklerde, ARC'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi. **(A)** Fotomikrograflar, deneklere uygun antagonist verilmesinin, agonistlerin enjeksiyonları ile arkuat çekirdekte aktive edilen nesfatin-1 nöron sayısında azalmaya neden olduğunu göstermektedir. **(B)** Sütun grafik ise NMDA agonisti ile aktive olmuş nesfatin-1 nöron sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

A**B**

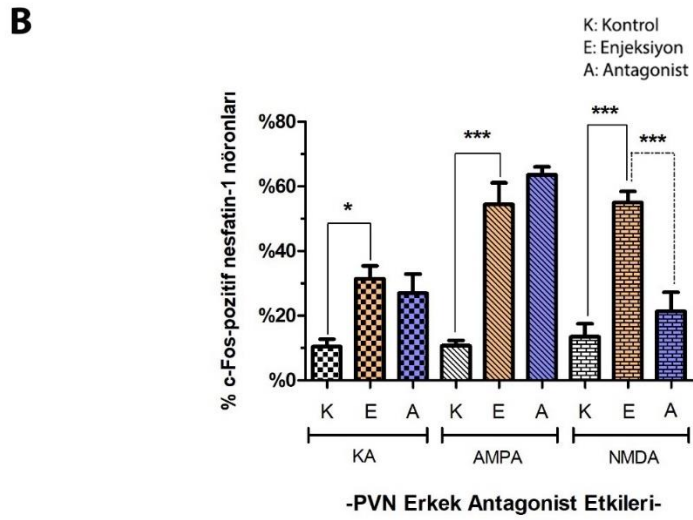
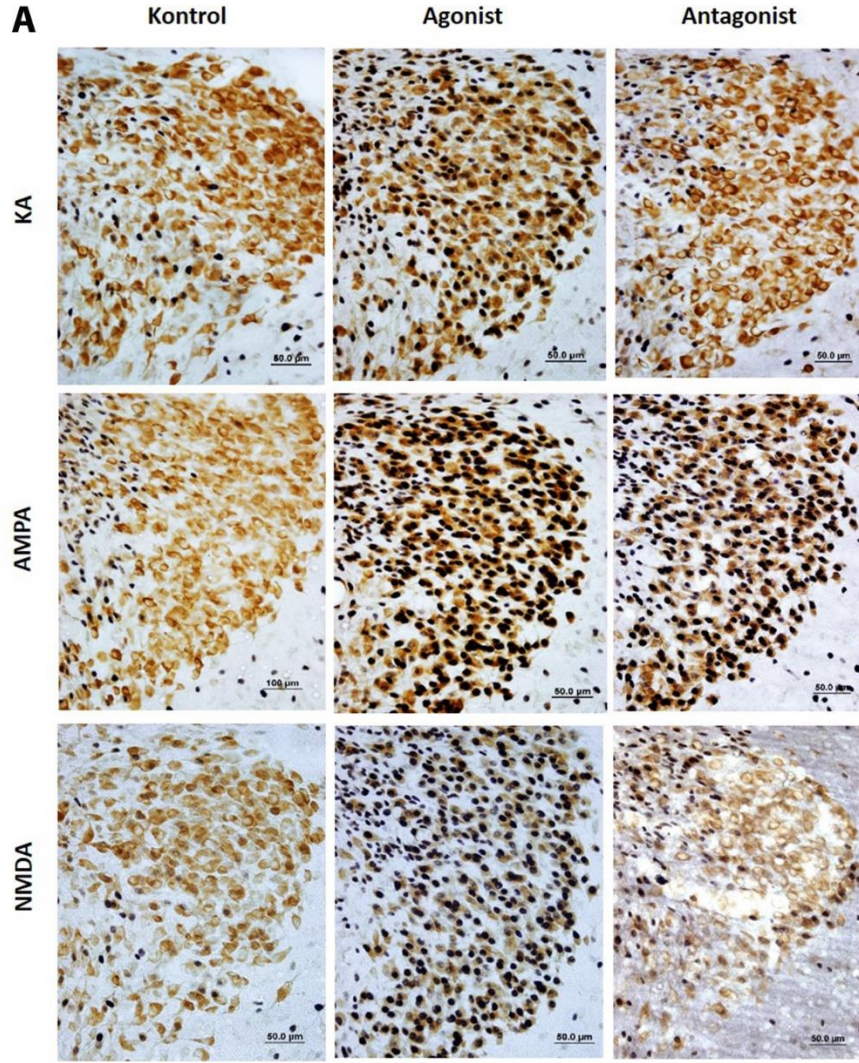
Şekil 27. Erkek deneklerde, ARC'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi. (A) Fotomikrograflar, deneklere özgün antagonist uygulaması sonrası arkuat çekirdekte aktive edilen nesfatin-1 nöron sayısındaki azalmayı göstermektedir. (B) Sütun grafik ise kainik asit ve NMDA agonistleri ile aktive olmuş nesfatin-1 nöron sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

PVN: Her üç agonistin enjeksiyonlarından önce özgün antagonist uygulanması paraventriküler çekirdekte aktive olan nesfatin-1 nöron sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtı. Kontrol deneklerde $6,62 \pm 1,32$ civarında olan c-Fos-pozitif nöron sayısı kainik asit enjeksiyonu ile $54,74$ 'e yükselirken, non-NMDA reseptör antagonisti CNQX uygulaması bu sayıyı $25,74 \pm 2,93$ 'e geriletmişti gözlemlendi. AMPA etkisiyle $62,79 \pm 3,76$ 'ya çıkan aktive nesfatin-1 nöronu sayısı CNQX etkisiyle $28,93 \pm 4,53$ 'e indi. NMDA enjeksiyonu, ikili işaretlenmiş nesfatin-1 nöron sayısını $50,50 \pm 2,52$ 'ye yükseltirken, MK801'in bu etkiyi baskıladığı ve oranın $20,62 \pm 4,51$ 'e indiği görüldü. Sonuç olarak, PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında glutamat agonistlerinin nöronal aktivasyona yönelik uyarıcı etkilerinin uygun antagonistlerce anlamlı bir şekilde baskılandığı belirlendi (Şekil 28).

Erkek deneklerde ise antagonist uygulaması sadece NMDA enjeksiyonu yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturdu. CNQX enjeksiyonu hem kainik asit hem de AMPA ile aktive olan gruplarda istatistiksel anlamlılığı olan bir etki göstermedi. Kontrol deneklerinde $10,44 \pm 2,33$ olan c-Fos'u eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının oranı kainik asit enjeksiyonu ile $31,41 \pm 4,05$ 'e yükselirken, CNQX etkisiyle $26,95 \pm 5,93$ 'lük bir değer elde edildi. Aktive nöron sayısı AMPA etkisiyle $10,67 \pm 1,71$ 'den $54,44 \pm 6,65$ 'e çıkarken, CNQX etkisiyle bu oran $63,54 \pm 2,45$ olarak belirlendi. En etkin blokasyon NMDA reseptörlerinde etki gösteren MK801'de görüldü. NMDA enjeksiyonu, kontrol grubunda $13,49 \pm 4,03$ olarak belirlenen nesfatin-1 nöron sayısını $54,96 \pm 3,47$ 'ye yükseltirken, MK801 bu etkiyi baskılayıp nöron sayısını $21,40 \pm 5,83$ 'e indirdi (Şekil 29).



Şekil 28. Dişi deneklerde, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi. (A) Fotomikrograflar, deneklere uygun antagonist verilmesinin, agonistlerin enjeksiyonları ile paraventricüler çekirdekte aktive edilen nesfatin-1 nöron sayısında azalmaya neden olduğunu göstermektedir. (B) Dişi deneklerde, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisinin grafiksel gösterimi (**p<0.01).



Şekil 29. Erkek deneklerde, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi. **(A)** Fotomikrograflar, deneklere uygun antagonist verilmesinin, agonistlerin enjeksiyonları ile paraventriküler çekirdekte aktive edilen nesfatin-1 nöron sayısında azalmaya neden olduğunu göstermektedir. **(B)** Erkek deneklerde, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisinin grafiksel gösterimi (* $p<0.05$, *** $p<0.001$).

Yukarıda sonuçları verilen çalışmaların istatistiki değerlendirmesinde kullanılan ve sayılan tüm nöronlara ait işlenmemiş verileri içeren bilgiler aşağıda Tablo 5-10'da verilmiştir.

Tablo 5. Dişi Sıçanların Supraoptik Çekirdeklerinde Lokalize Olan Nesfatin-1 Nöronlarındaki c-Fos Ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	1428.60 ± 425.60	15.80 ± 8.70	1.20 ± 0.58
	Enjeksiyon	1485.20 ± 306.66	1135.00 ± 189.32	79.03 ± 4.70
	Antagonist (CNQX)	2101.80 ± 135.62	641.00 ± 77.26	30.88 ± 3.80
AMPA	Kontrol	2181.40 ± 287.08	43.40 ± 16.53	2.00 ± 0.69
	Enjeksiyon	1974.60 ± 167.81	1630.40 ± 115.44	83.27 ± 3.37
	Antagonist (CNQX)	1951.40 ± 203.16	1039.80 ± 235.69	55.06 ± 11.15
NMDA	Kontrol	2975.20 ± 247.35	157.60 ± 44.50	5.13 ± 1.33
	Enjeksiyon	2109.60 ± 281.93	1523.20 ± 274.60	70.83 ± 5.06
	Antagonist (MK801)	2158.60 ± 130.89	173.00 ± 62.00	8.49 ± 3.03

Tablo 6. Erkek Sıçanların Supraoptik Çekirdeklerinde Lokalize Olan Nesfatin-1 Nöronlarındaki c-Fos Ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	2471.00 ± 444.75	34.00 ± 12.19	1.47 ± 0.40
	Enjeksiyon	2427.40 ± 200.55	1250.00 ± 253.68	50.18 ± 6.89
	Antagonist (CNQX)	1878.60 ± 243.92	661.80 ± 172.66	39.47 ± 10.81
AMPA	Kontrol	2634.00 ± 189.78	41.00 ± 16.60	1.564 ± 0.69
	Enjeksiyon	2678.40 ± 157.59	2106.40 ± 213.53	78.85 ± 7.55
	Antagonist (CNQX)	2756.80 ± 115.30	2367.80 ± 140.67	86.03 ± 4.31
NMDA	Kontrol	2354.80 ± 276.78	256.40 ± 47.22	11.65 ± 2.67
	Enjeksiyon	3012.00 ± 42.43	2631.60 ± 96.75	87.26 ± 2.11
	Antagonist (MK801)	1912.00 ± 173.57	446.60 ± 115.03	24.24 ± 6.52

Tablo 7. Dişi Sıçanların Arkuat Çekirdeklerinde Lokalize Olan Nesfatin-1 Nöronlarındaki c-Fos Ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	3315.00 ± 881.48	125.00 ± 48.03	2.92 ± 0.79
	Enjeksiyon	2626.40 ± 479.28	396.60 ± 60.60	16.20 ± 2.60
	Antagonist (CNQX)	3421.60 ± 597.19	421.80 ± 126.17	14.93 ± 4.86
AMPA	Kontrol	2147.80 ± 137.27	100.80 ± 27.16	4.56 ± 1.19
	Enjeksiyon	3757.20 ± 617.53	385.00 ± 107.81	9.78 ± 1.28
	Antagonist (CNQX)	2698.00 ± 417.31	378.00 ± 97.79	13.20 ± 2.62
NMDA	Kontrol	5615.40 ± 1474.63	614.20 ± 144.01	11.79 ± 1.59
	Enjeksiyon	2862.00 ± 539.49	676.80 ± 162.07	23.15 ± 3.05
	Antagonist (MK801)	3986.20 ± 214.74	239.00 ± 27.75	6.15 ± 0.98

Tablo 8. Erkek Sıçanların Arkuat Çekirdeklerinde Lokalize Olan Nesfatin-1 Nöronlarındaki c-Fos Ekspresyonu

Glutamat Agonist Grupları		Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	4854.20 ± 1243.88	973.00 ± 267.00	19.53 ± 1.61
	Enjeksiyon	3488.40 ± 528.37	1068.40 ± 125.99	31.54 ± 2.56
	Antagonist (CNQX)	3937.00 ± 836.44	647.20 ± 152.81	16.03 ± 1.11
AMPA	Kontrol	3194.40 ± 595.49	498.40 ± 109.80	15.90 ± 3.62
	Enjeksiyon	2133.60 ± 207.08	499.80 ± 113.04	22.72 ± 3.59
	Antagonist (CNQX)	3711.40 ± 248.68	540.40 ± 35.85	14.71 ± 1.14
NMDA	Kontrol	3803.20 ± 778.48	596.60 ± 105.32	17.29 ± 2.05
	Enjeksiyon	3214.40 ± 364.78	740.80 ± 70.69	23.34 ± 1.55
	Antagonist (MK801)	2570.20 ± 317.41	192.20 ± 38.71	7.53 ± 1.33

Tablo 9. Dişi Sıçanların Paraventriküler Çekirdeklerinde Lokalize Olan Nesfatin-1 Nöronlarındaki c-Fos Ekspresyonu

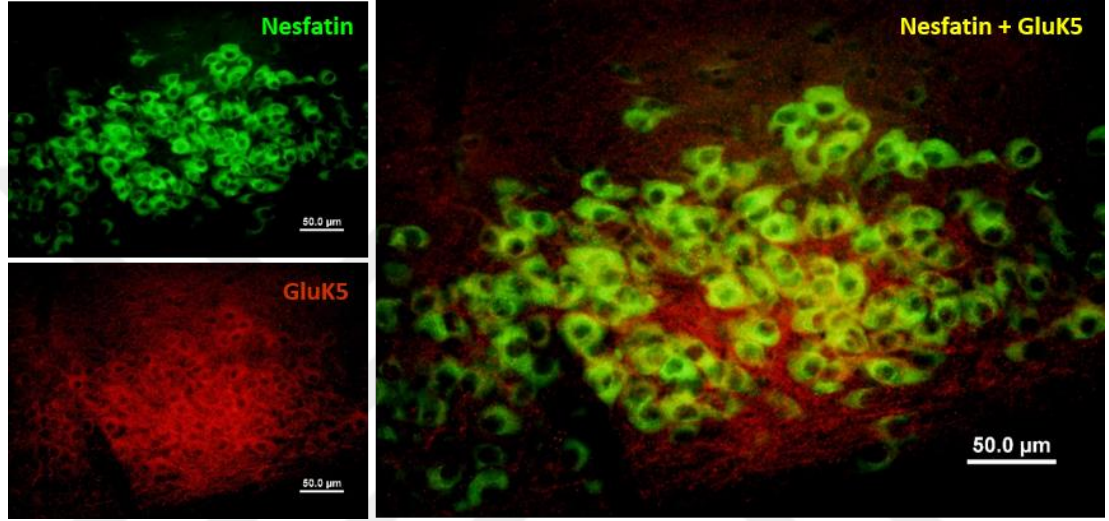
Glutamat Agonist Grupları		Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	1857.20 ± 433.93	139.40 ± 49.67	6.62 ± 1.32
	Enjeksiyon	854.60 ± 251.37	442.60 ± 125.12	54.74 ± 3.51
	Antagonist (CNQX)	1120.60 ± 191.36	276.60 ± 45.53	25.74 ± 2.93
AMPA	Kontrol	1857.20 ± 433.93	139.40 ± 49.67	6.62 ± 1.32
	Enjeksiyon	1349.80 ± 292.61	833.00 ± 160.47	62.79 ± 3.74
	Antagonist (CNQX)	1865.00 ± 597.08	464.80 ± 133.88	28.94 ± 4.53
NMDA	Kontrol	1857.20 ± 433.93	139.40 ± 49.67	6.62 ± 1.32
	Enjeksiyon	2911.00 ± 381.37	1457.80 ± 177.79	50.50 ± 2.52
	Antagonist (MK801)	1381.40 ± 74.14	281.20 ± 61.82	20.62 ± 4.51

Tablo 10. Erkek Sıçanların Paraventriküler Çekirdeklerinde Lokalize Olan Nesfatin-1 Nöronlarındaki c-Fos Ekspresyonu

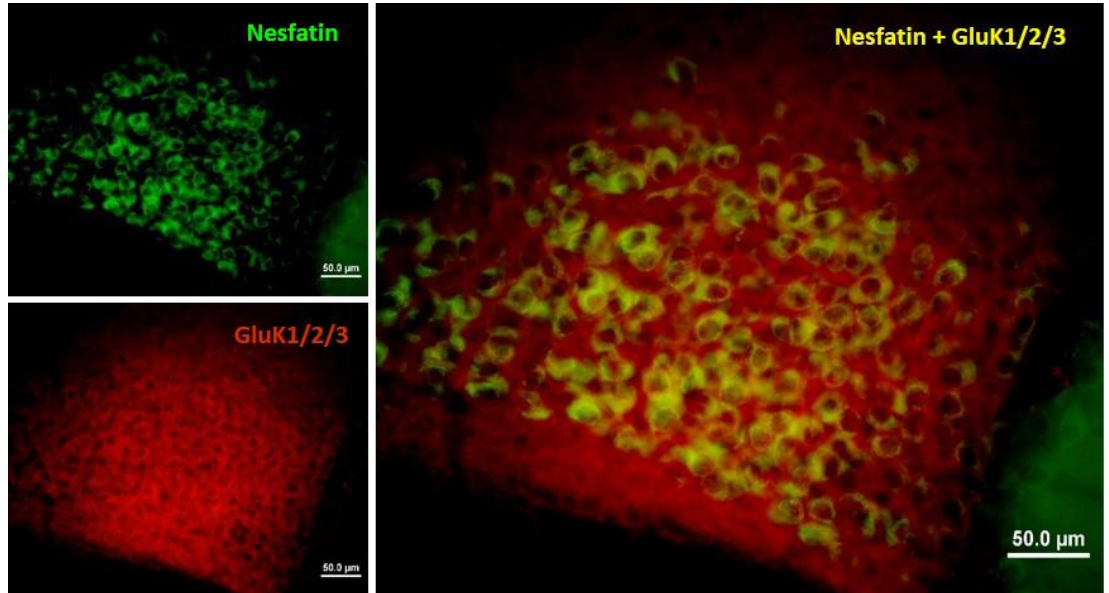
Glutamat Agonist Grupları		Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Sayıları	c-Fos'u Eksprese Eden Nesfatin Nöronlarının Ortalama Yüzdeleri
KAİNİK ASİT	Kontrol	1189.40 ± 141.47	129.20 ± 28.98	10.44 ± 2.33
	Enjeksiyon	1057.66 ± 100.63	317.00 ± 56.73	31.41 ± 4.05
	Antagonist (CNQX)	773.00 ± 47.12	215.80 ± 59.74	26.95 ± 5.93
AMPA	Kontrol	1134.60 ± 90.70	122.40 ± 24.12	10.67 ± 1.71
	Enjeksiyon	1246.80 ± 75.05	670.20 ± 82.16	54.44 ± 6.65
	Antagonist (CNQX)	1384.20 ± 122.15	875.80 ± 76.26	63.54 ± 2.45
NMDA	Kontrol	1056.80 ± 103.02	134.20 ± 31.39	13.49 ± 4.03
	Enjeksiyon	1081.20 ± 78.94	591.60 ± 48.84	54.96 ± 3.47
	Antagonist (MK801)	645.00 ± 74.52	139.00 ± 44.67	21.40 ± 5.83

4.3.5. Nesfatin-1 Nöronlarında Glutamat Reseptör Alt Birimlerinin Ekspresyonu

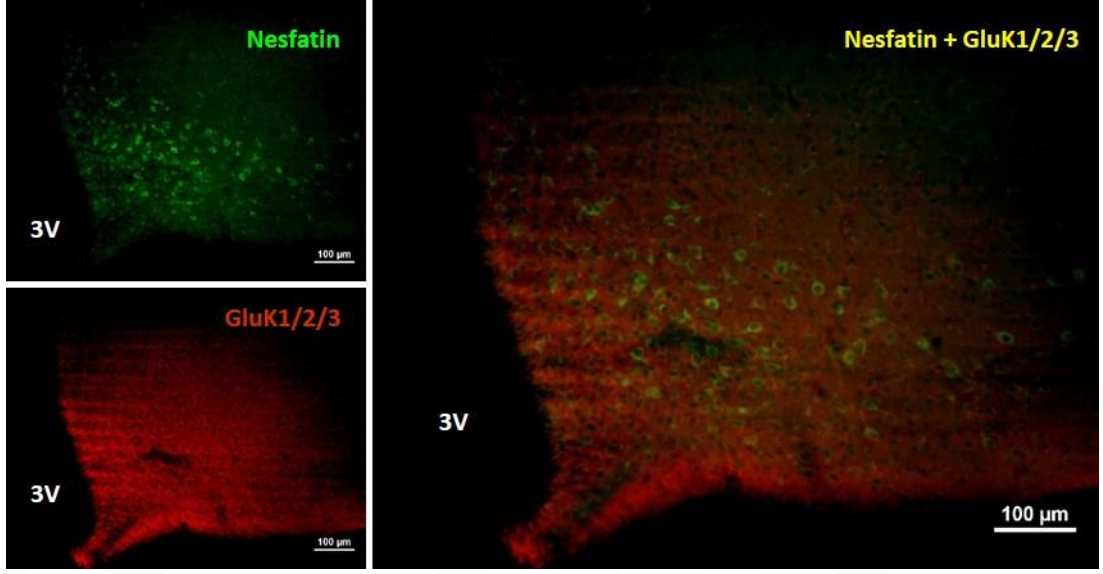
İkili immüno Floresan çalışmaları, nesfatin-1 nöronlarının glutamat reseptörlerinin kainat reseptörü alt ailesine ait yüksek afiniteli GLUK5 alt birim proteinini tanıyan antikor ile işaretlendiğini gösterdi (Şekil 30). Supraoptik çekirdek ve arkuat çekirdekte düşük afiniteli GluK1, GluK2 ve GluK3 kainat reseptörlerinin hepsini birden tanıyan antikor ile yapılan boyamalar, çok sayıda nesfatin-1 nöronunda bu proteinlerin eksprese olduklarını belirledi (Şekil 31 ve 32).



Şekil 30. SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında GluK5 reseptör proteinini ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. Alexa 488 ile işaretli nesfatin-1 nöronları yeşil, Alexa 594 ile işaretli GLUK5 reseptör proteinini eksprese eden nöronlar ise kırmızı renkte görülmektedir. GLUK5 reseptör proteinini eksprese eden nesfatin-1 nöronları sarı renkte izlenmektedir.

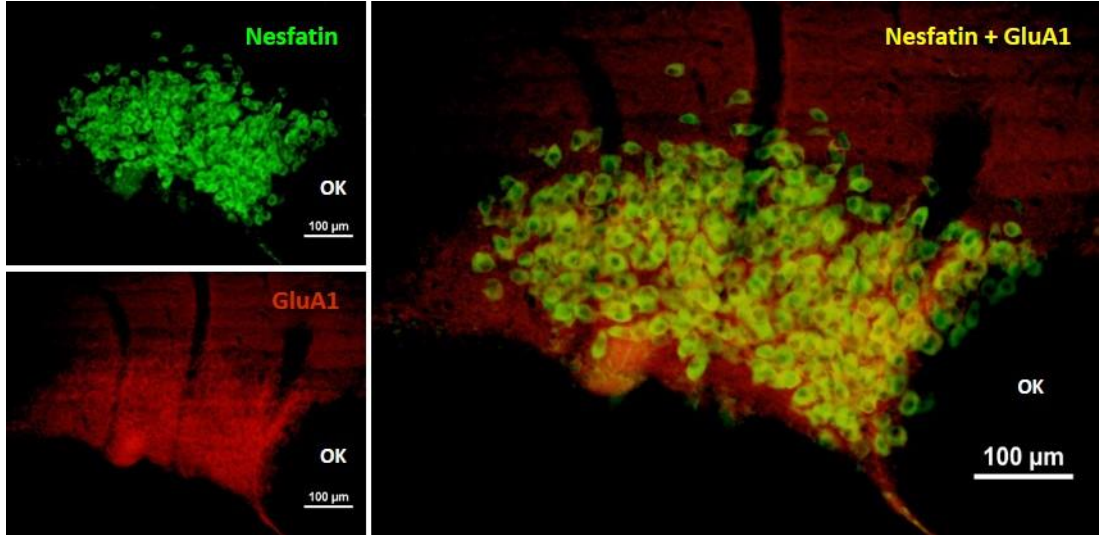


Şekil 31. SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında GluK1/2/3 reseptör proteinini ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü.

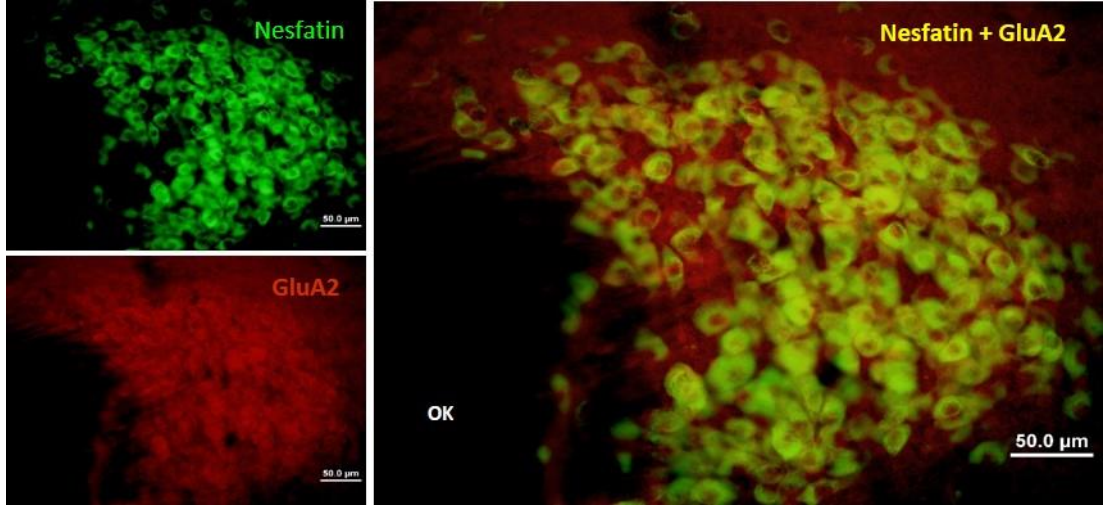


Şekil 32. ARC'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında GluK1/2/3 reseptör proteini ekspresyonunun immüno Floresan görüntüsü. 3V: 3. ventrikül

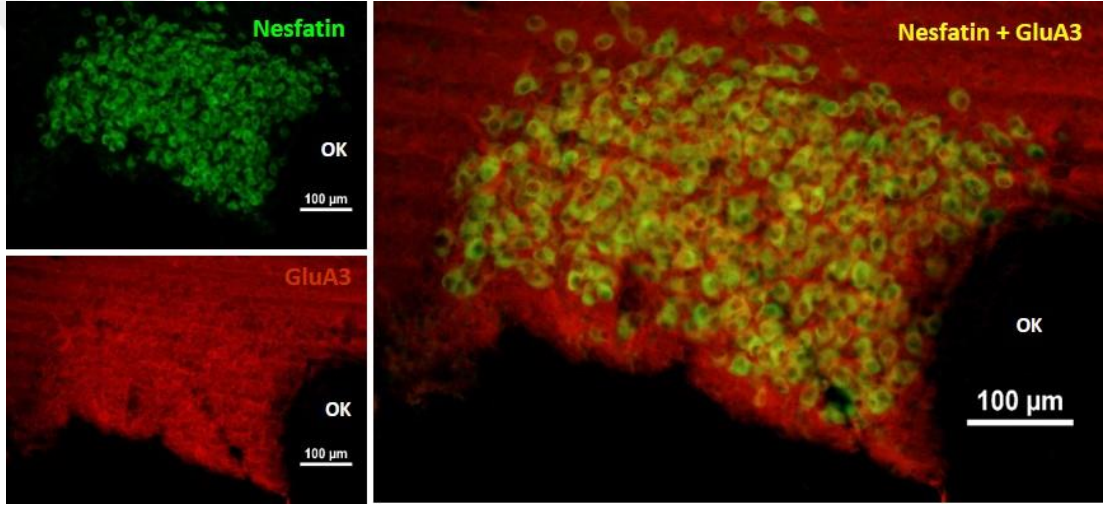
AMPA reseptörleri alt ailesinden GluA1 alt birim proteininin, supraoptik çekirdek nesfatin-1 nöronlarında ko-eksprese olduğu görüldü (Şekil 33). GluA2 çoğu nesfatin-1 nöronunda mevcutken (Şekil 34), GluA3 (Şekil 35) ve GluA4 (Şekil 36) sadece bir grup nesfatin-1 nöronunda gözlemlendi.



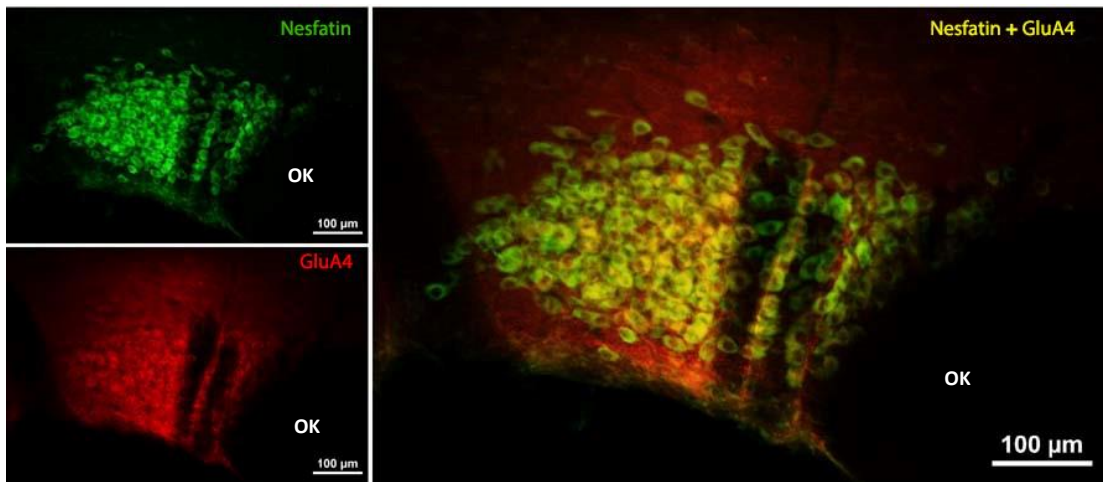
Şekil 33. SON'de nesfatin-1 nöronlarında GluA1 reseptör proteini ekspresyonu. OK: Optik kiazma.



Şekil 34. SON'de nesfatin-1 nöronlarında GluA2 reseptör proteini ekspresyonu. OK: Optik kiazma

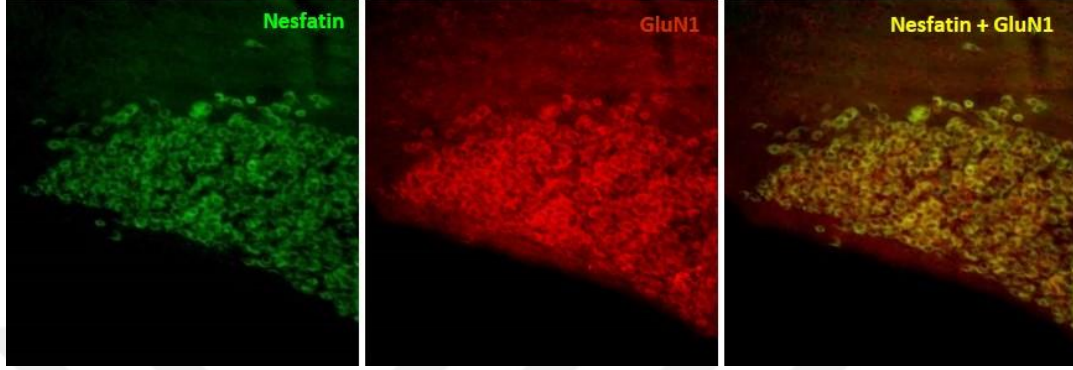


Şekil 35. SON'de nesfatin-1 nöronlarında GluA3 reseptör proteini ekspresyonu. OK: Optik kiazma

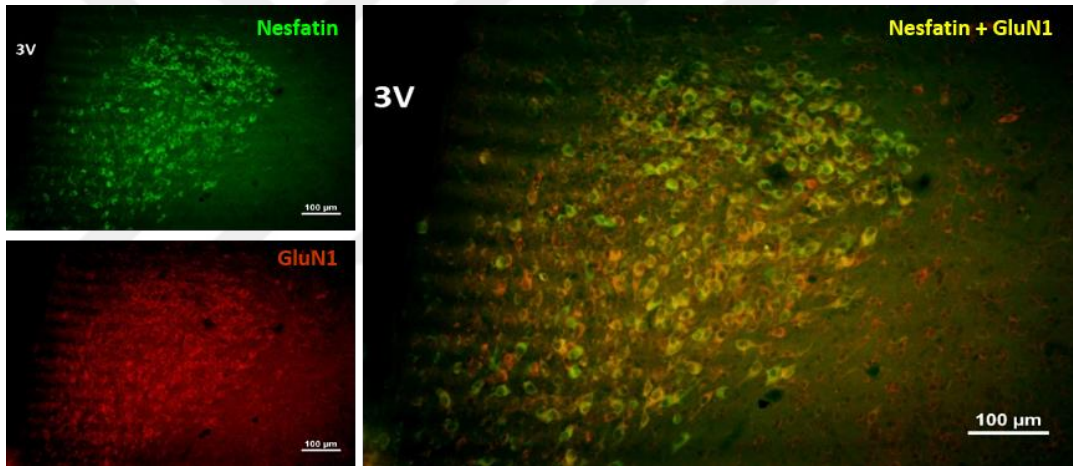


Şekil 36. SON'de nesfatin-1 nöronlarında GluA4 reseptör proteini ekspresyonu. OK: Optik kiazma

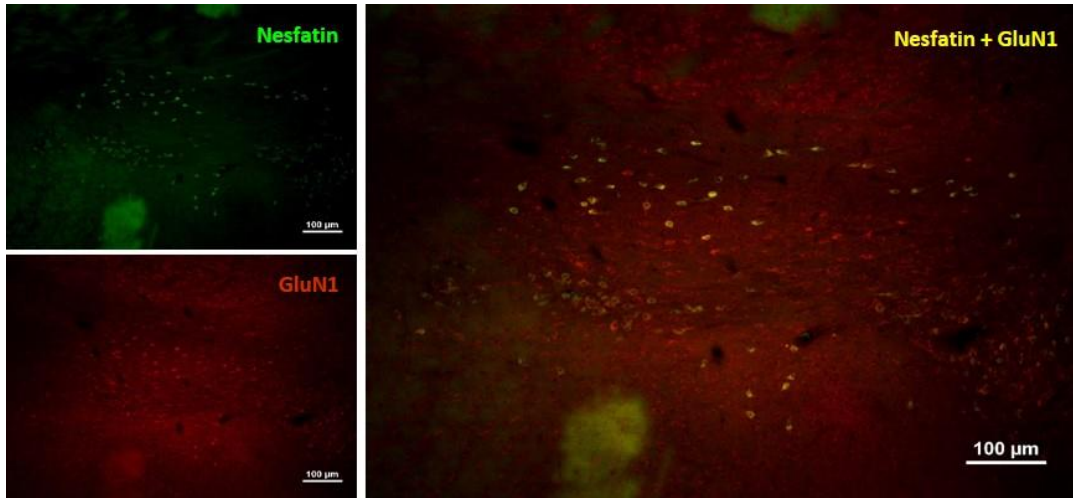
NMDA reseptörleri alt ailesi proteinlerinden GluN1'in supraoptik çekirdek, paraventriküler çekirdek ve lateral hipotalamustaki nesfatin-1 nöronlarında (Şekil 37, 38, 39 ve 40) ve GluN2A (Şekil 41) alt biriminin de supraoptik çekirdek nesfatin-1 nöronlarında eksprese edildikleri belirlendi.



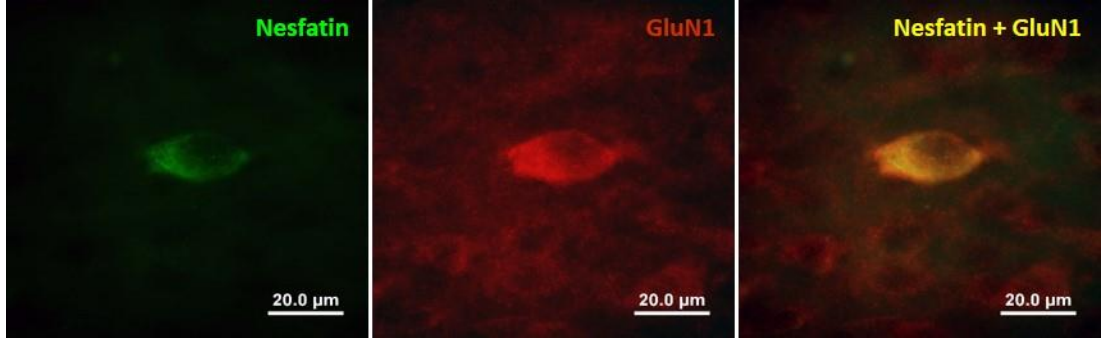
Şekil 37. SON'de nesfatin-1 nöronlarında GluN1 reseptör proteinini ekspresyonu.



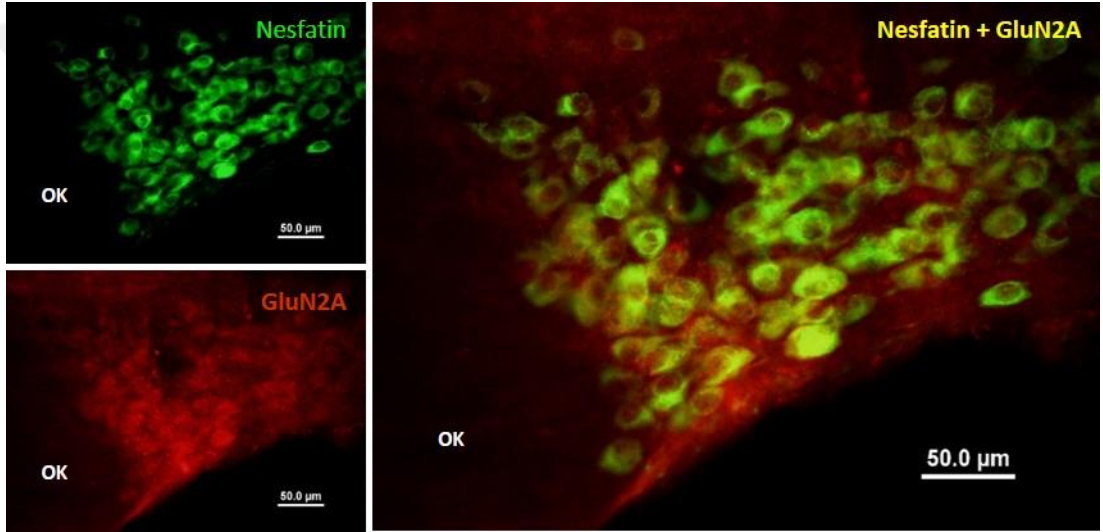
Şekil 38. PVN'de nesfatin-1 nöronlarında GluN1 reseptör proteinini ekspresyonu. 3V: 3. ventrikül



Şekil 39. Lateral hipotalamusta nesfatin-1 nöronlarında GluN1 reseptör proteinini ekspresyonu.



Şekil 40. Lateral hipotalamusta ikili immüno Floresan işaretli GluN1 içeren nesfatin-1 nöronlarının büyük büyütme ile görünümü. Alexa 488 ile işaretli nesfatin-1 nöronu yeşil, Alexa 594 ile işaretli GluN1 reseptör proteinini ekspres eden nöron ise kırmızı renkte görülmektedir. GluN1 reseptör proteinini ekspres eden nesfatin-1 nöronu sarı renkte izlenmektedir.



Şekil 41. SON'de nesfatin-1 nöronlarında GluN2A reseptör proteini ekspresyonu. OK: Optik kiazma

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kurgulanan hipotez test edilerek doğrulanmıştır. Elde edilen deneysel sonuçlar özgün hedef sıralamasına göre aşağıda tartışılmıştır.

Nesfatin-1 Nöronlarının Hipotalamustaki Lokalizasyonları

Nesfatin-1 peptidinin hipotalamustaki ekspresyon paterni ilk olarak Oh-I ve ark. (2006) tarafından beslenmenin merkezi düzenlenmesinde rol alan hipotalamik çekirdeklerde gösterilmiştir. Tez çalışmalarında nesfatin-1'i içeren nöronların hipotalamustaki lokalizasyonlarının literatürle uyumlu olduğu belirlenmiş ve bu nöronların hipotalamusun supraoptik çekirdek, arkuat çekirdek, paraventriküler çekirdek, Edinger-Westphal çekirdek, lateral hipotalamik alan ile periventriküler çekirdekte lokalize nöronlarca sentezlendiği immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir.

Nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda glutamaterjik sistemin rolünün araştırılması (Farklı glutamat reseptör agonistlerinin -Kainik asit, AMPA ve NMDA- nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna olan etkisinin gösterilmesi)

Çalışmanın birinci özgün amacına yönelik deneylerden, “nesfatin-1 nöronları glutamaterjik sistem tarafından regüle edilmektedir” yönündeki hipotezi destekleyen/kanıtlayan sonuçlar elde edilmiştir. İyonotropik non-NMDA ve NMDA glutamat reseptörleri üzerinden etki eden tüm glutamat agonistlerinin, nesfatin-1 nöronlarının önemli bir bölümünde aktivasyon etkisi gösterdiği belirlenmiş ayrıca bu aktivasyonda c-Fos proteininin kullanıldığı hücre içi yolların rol oynadığı gösterilmiştir.

Çalışmalarımızda temel olarak aktive olan nesfatin-1 nöronlarının hipotalamik supraoptik çekirdekte, arkuat çekirdekte, paraventriküler çekirdekte, Edinger-Westphal çekirdeğinde, periventriküler çekirdekte ve lateral hipotalamik alanda lokalize oldukları görülmüştür. Tez çalışması kapsamında sadece supraoptik çekirdek, arkuat çekirdek ve paraventriküler çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronları değerlendirilmiş, diğer alanlarda yerleşik nesfatin-1 nöronlarının incelenmesi tezin tamamlanması için belirlenen süreden çok daha fazla zaman gerektireceğinden kapsam dışında bırakılmıştır.

Dişi deneklerde, supraoptik çekirdekteki c-Fos-pozitif nesfatin-1 nöronları oranının kontrolleriyle karşılaştırıldığında kainik asit, AMPA ve NMDA enjeksiyonu ile 40 ila 65 kat arttığı gözlemlendi. Bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Kainik asit ve AMPA non-NMDA reseptörleri agonisti olarak SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında bazal c-Fos ekspresyonunu uyarmaktadır. Çalışmalarımız bu iki agonist etkisiyle dişi deneklerdeki aktive nesfatin-1 nöronu sayısının yaklaşık %80'e ulaştığını gösterdi. NMDA enjeksiyonunun ise biraz daha az nöronu etkileyerek %70'lik bir aktivasyona neden olduğu belirlendi. Dolayısıyla her üç agonist de nesfatin nöronlarını etkilemekte ve aktivasyon sağlamaktadır. c-Fos ekspresyonu nöronlarda genetik aktivasyona yönelik bir etkinin ortaya çıktığını belirten bir gösterge olduğuna göre (Hoffman ve ark., 1993) nesfatin-1 nöronlarında, senteze ve/veya salgılamaya yönelik bir genetik hareketliliğin, glutamat tarafından tetiklendiğini söylemek mümkündür. Bölümümüzde gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda da glutamat agonistlerinin benzer etkilerinin varlığı oksitosin, oreksin ve nörostatin gibi farklı nöroendokrin nöronlarda gösterilmiştir (Eyigor ve ark., 2010; Eyigor ve ark., 2012; Minbay ve ark., 2006; Serter ve ark., 2016).

İlginç olarak, erkek deneklerde nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyonun varlığı ve oranı agonist etkilerine göre farklılık gösterdi. Erkek deneklerin SON'deki nesfatin-1 nöronları kainik asit enjeksiyonuna diğer iki agoniste göre daha az tepki vermiştir. AMPA (%78) ve NMDA (%87) etkisine göre, istatistiki olarak anlamlı sayıda az nesfatin-1 nöronu kainik asit etkisiyle (%50) aktive olmuştur. Bu sonuç kainik asiti bağlayan fonksiyonel glutamat reseptörleri açısından erkek ve dişi denekler arasında cinsiyete bağlı farklı etkileşimlerin var olduğunu göstermektedir. Cinsiyete bağlı değişik etkileşimler özellikle nöroendokrin alanlarda görülmekte ve önem

taşımaktadır (Sakuma, 2009). Erkek deneklerde aktive olan nesfatin-1 nöronlarındaki bazal c-Fos ekspresyonundaki artış en çok NMDA tarafından gerçekleşmiştir. Dolayısıyla dişi bireylerin nesfatinerjik sisteminde en potent etkiyi AMPA gösterirken, erkek deneklerde en güçlü agonist olarak NMDA belirlenmiştir. Bu sonuçların literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Dişi deneklerde, paraventriküler çekirdekte her üç agonistin enjeksiyonu sonrasında c-Fos'u eksprese eden nesfatin-1 nöronlarının oranının 9 ila 10 kat kadar arttığı gözlemlendi. Aktive nöron sayıları kontrol deneklerle karşılaştırıldığında bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu, tüm agonistlerin benzer oranda (KA %54, AMPA %62 ve NMDA %50) nesfatin-1 nöronunu aktive ettiği bulundu. Erkek deneklerde ise nesfatin-1 nöronlarındaki aktivasyonun varlığı ve oranı agoniste göre değişiklik gösterdi. Kontrolleriyle karşılaştırıldığında her üç agonistin de c-Fos immünreaktivitesi gösteren nesfatin-1 nöronlarının sayısında anlamlı bir artışa neden olduğunu gösterdi. AMPA (%54) ve NMDA (%54) etkilerinin benzer olduğu, bu etkilerin kainik asitle (%31) ile karşılaştırıldığında istatistiki anlam taşıyacak şekilde daha güçlü olduğu belirlendi. Hem agonist etkilerinin erkek deneklerde farklılık göstermesi, hem de kainik asit etkisinin dişi deneklerde erkek deneklere göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla olması, kainik asiti bağlayan fonksiyonel glutamat reseptörleri açısından cinsiyete bağlı farklı etkileşimlerin var olduğunu düşündürmüştür.

Santral oksitosin sistemi, çoğunlukla hipotalamusun supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerinde yer alan nöronlardan oluşmaktadır. Oksitosin üreten nöronlar, magnosellüler ve parvosellüler oksitosin nöronları olmak üzere 2 alt grupta incelenirler (Yosten, 2013). Hem SON'de hem de PVN'de bulunan magnosellüler oksitosin nöronları aksonlarını nörohipofize (arka hipofize) doğru uzatarak oksitosini genel dolaşıma salarlar. Ayrıca, bu nöronlar komşu nöronlar üzerindeki hormonal etkilerini göstermek için dendritleri aracılığıyla da oksitosin salınımı yapabilirler. Dendrit aracılığıyla salınan oksitosinin bazı otopregülatör olaylara ve nörohormonal etkilere sahip olduğu literatürde gösterilmiştir (Neumann, 2007; Sabatier ve ark., 2003).

Paraventriküler çekirdekte yerleşik parvosellüler oksitosin nöronları da besin alımı ve homeostatik mekanizmaları etkilemek için uzantılarını beyin sapı ve diğer

beyin bölgelerine gönderirler. Tüm oksitosin nöronlarının; sodyum iştahının, beslenmenin, maternal davranışların, merkezi kardiyovasküler kontrolün ve üremenin hipotalamik regülasyonunda fizyolojik olarak rol oynadığı çoğu araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Kirchgessner ve ark., 1988; Michelini ve ark., 2003; Puryear ve ark., 2001).

Merkezi melanokortin sistemi gibi, santral oksitosin sisteminin de iştahın kontrolünde önemli olduğu gösterilmiştir. Merkezi olarak enjekte edilen oksitosinin doz bağımlı olarak erkek sıçanlarda gıda alımını azalttığı (Arletti ve ark., 1989; Olson ve ark., 1991a; Olson ve ark., 1991b), oksitosin-eksikliği olan farelerin önemli miktarlarda sükröz (Miedlar ve ark., 2007) ve sodyum (Amico ve ark., 2001) içtiği, ayrıca bu farelerde obezitenin geliştiği (Takayanagi ve ark., 2008) araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.

Aslında çoğu kanıt, 'oksitosin'in santral melanokortin sisteminin aşağı yöndeki (downstream) mediyatörü' olduğu hipotezini desteklemektedir. Melanokortin 3/4 reseptör agonisti α -MSH'in intraserebroventriküler uygulaması, oksitosin üreten nöronlarda c-Fos birikimine neden olurken (Caquineau ve ark., 2006) NUCB2 geninin ekspresyonunu arttırmaktadır (Oh-I ve ark., 2006). Ayrıca, melanokortin 3/4 reseptör antagonistinin (SHU9119) merkezi olarak verilmesiyle nesfatin-1'in gıda alımı üzerindeki inhibitör etkisinin tersine döndürüldüğü gösterilmiştir (Yosten ve Samson, 2009). Tüm bu sonuçlar aslında nesfatin-1'in anoreksijenik aktivitesini ortaya koyması için işlevsel beyin melanokortin reseptörlerinin varlığına gereksinim duyduğunu göstermektedir.

PVN ve SON'deki NUCB2/nesfatin-1 nöronlarının büyük bir kısmının oksitosin, vasopresin ve kortikotropin salıcı hormon nöronlarıyla ko-lokalize oldukları çoğu literatürde gösterilmiştir (Foo ve ark. 2008; Kohno ve ark., 2008; Noetzel ve ark., 2009). Aç bırakılan sıçanların tekrar beslenmesi, hem nesfatin-1'i hem de oksitosini ko-eksprese eden nöronlarda c-Fos'un artışına neden olmuştur. Çalışmalarımız kapsamında elde edilen sonuçlar agonist enjeksiyonları sonrasında nesfatin-1'i eksprese eden çoğu nöronda c-Fos proteininin artışı yönündeydi. Bu bilgiler doğrultusunda PVN ve SON'i birbirine benzer etkileri olan hipotalamik çekirdekler olarak düşünebiliriz. Bu nedenle de SON'de değerlendirdiğimiz nesfatin-1 nöronlarının PVN nesfatin-1 nöronları için genel bir bilgi sağladığını düşünmekteyiz.

Arkuat çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarının bazal durumlarda SON'deki nöronlardan daha fazla aktivasyon gösterdikleri belirlendi. Hem dişi hem erkek kontrol deneklerde SON nesfatin-1 nöronları oranı %1 ila %11 arasında iken, dişi deneklerin arkuat çekirdeğinde bu oran %3-10 arasında, erkek deneklerde ise daha yüksek oranlarda (%15-20) belirlendi. Bazal durumlarda ARC'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının SON ve PVN'deki nöronlardan daha fazla aktivasyon gösterdiklerinin belirlenmesi, ARC nesfatin-1 nöronlarının bazal nesfatin-1 sentezinde daha yoğun olarak fonksiyon gösterdiklerini düşündürdü. Yüksek bazal değerlere rağmen glutamat agonistlerinin enjeksiyonu arkuat çekirdekte de anlamlı sayıda daha fazla nesfatin-1 nöronunu aktive etti. Sadece erkek deneklerde AMPA uygulanan grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark belirlenemedi. Ayrıca dişi deneklerin arkuat çekirdeğinde NMDA'nın, erkek deneklerinkinde ise kainik asitin en etkili agonist olduğu anlaşıldı. Bu sonuçlar, glutamatın arkuat çekirdek nesfatin-1 nöronları üzerinde SON ve PVN nesfatin-1 nöronlarına göre farklı regülasyona sahip olduğunu düşündürmektedir. Kainik asit ve AMPA'nın arkuat çekirdek nesfatin-1 nöronları açısından erkek deneklerde dişilere göre bir kat daha potent olduğu, erkeklerde daha çok sayıda nesfatin-1 nöronunu aktive ettiklerinin belirlenmesiyle anlaşılmıştır. Bu sonuçlar arkuat çekirdek glutamat etkileşiminde de cinsiyete bağlı farklılıkların var olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmalarda agonist etkilerinin anlamlı bir şekilde uygun antagonistlerce baskılandığı belirlenmiştir. Dişi deneklerin supraoptik çekirdeklerinde, MK801'in aktive olan nesfatin-1 nöronlarındaki NMDA etkisini neredeyse kontrol düzeyine indirmiş olması sebebiyle en potent etkiyi yaptığını söyleyebiliriz. Hem kainik asit hem de AMPA antagonisti olarak işlev gören CNQX'in özellikle kainat reseptörü antagonizmasında etkili olduğu belirlendi. Erkek deneklerde ise sadece NMDA enjeksiyonu yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiş, non-NMDA reseptör antagonisti diğer iki grupta etki göstermemiştir. Paraventriküler çekirdekteki antagonist etkileri incelendiğinde, SON'deki antagonist etkilerine benzeyen etkiler görülmüştür. Dişi deneklerde agonist enjeksiyonlarına özgün olan her üç antagonistin baskılayıcı etkisi istatistiki anlamlılık gösterirken, erkek deneklerde sadece MK801'in potent etkisi anlamlı bulundu. Antagonist etkileri açısından

değerlendirildiğinde hem SON hem de PVN çekirdek de blokörlerin birbirine benzer fonksiyonları gösterdiğini söyleyebiliriz.

Dişi deneklerin arkuat çekirdeğinde aktive olan nesfatin-1 nöronlarının sadece NMDA antagonisti ile baskılandığı belirlendi. Non-NMDA reseptör antagonisti CNQX'in agonistlerinin etkilerini ortadan kaldıramadığı görüldü. Erkek deneklerde ise KA ve NMDA enjeksiyonu yapılan gruplarda belirgin bir şekilde baskılayıcı etki gözlenirken, AMPA uygulanan grupta bu etki gözlenemedi. Antagonistlerin anlamlı bir şekilde aktive olan nesfatin nöronu sayılarını azaltmaları glutamatın nesfatin nöronlarındaki düzenleyici etkisinin özgün olduğunu düşündürmektedir.

Nöronal aktivasyonu belirlemede kullanılan diğer iki hücre içi haberleşme belirteçlerinden pCREB'in ekspresyonu incelendiğinde, agonistlerin hiçbirinin nesfatin-1 nöronlarındaki CREB fosforillenmesini değiştirmediği, kontrol deneklerle agonist enjeksiyonu yapılmış denekler arasında bir farklılığın olmadığı görüldü. PVN, SON ve LH'da yer alan tüm nesfatin-1 nöronlarında pCREB pozitifliği görülmesi bu nöronlardaki agonist etkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesini anlamsız hale getirdi. Bu sonuç iki şekilde yorumlandı: 1. Nesfatin-1 nöronları bazal durumlarda bile CREB fosforilasyonunu gerçekleştirecek hücre içi fonksiyonlara sahip olabilir, 2. Agonist etkileri dışında etki eden farklı sinyaller, CREB'i fosforilleyerek nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunda rol oynayabilmektedir.

pSTAT5 ekspresyonu ise sadece periventriküler alandaki bazı nesfatin-1-pozitif nöron grubunda belirlendi. Ancak bu ekspresyonda kontrol ve enjeksiyon grubu deneklerde bir farklılığın görülmemesi, glutamat agonistlerinin nesfatin-1 nöronlarında STAT5 proteinini içeren bir yolağı aktif hale getirmediğini ya da var olan bazal seviyedeki fosforillenmeyi değiştirmediğini düşündürdü. SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarında ise glutamat agonistlerinin STAT yolaklarını aktive edici etkisi belirlenemedi. Bu sonuç da iki yaklaşımla açıklandı: 1. SON'deki nesfatin-1 nöronlarında STAT proteininin eksprese olamaması, 2. Agonist etkilerinin STAT yolağını stimüle etmemesi.

Nesfatin-1 nöronlarında eksprese edilen glutamat reseptör alt birim protein ekspresyonlarının gösterilmesi (Kainat için GluK1, GluK2, GluK3 ve GLUK5; AMPA için GluA1, GluA2, GluA3, GluA4; NMDA için GluN1 ve GluN2A)

Glutamaterjik nörotransmisyonunda yer alan glutamatın etki mekanizması ile reseptörlerinin alt birim kompozisyonları hakkında pek çok çalışma vardır (Malarkey ve Parpura 2008; Niciu ve ark., 2012). İn situ hibridizasyon tekniği kullanılarak elde edilen veriler, NMDA reseptör ailesinden GluN1'in, AMPA reseptör ailesinden GluA1'in ve kainat reseptör ailesinden GluK5 alt birim mRNA'larının hipotalamusta en çok ve en yaygın bulunan alt birimler olduğunu gösterirken; NMDA reseptör ailesinden GluN2C ve GluN2D, AMPA reseptör ailesinden GluA3, GluA4 ve kainat reseptör ailesinden GluK1, GluK2 ve GluK3 mRNA'larının daha az hücrede ve daha zayıf bir hibridizasyon sinyaliyle bulunduğunu göstermiştir (Eygör ve ark., 2001). Northern blot analiziyle yapılan bir başka çalışmada da GluA1 ve GluA2 transkriptlerinin GluA3-4 ve GluK1-3 transkriptlerinden daha yüksek yoğunlukta bulunduğu bildirilmiştir (Van den Pol ve ark., 1994). İmmünohistokimya çalışmaları ile supraoptik ve paraventriküler çekirdeklerdeki magnosellüler nöronlarda GluN1 (Petralia ve ark., 1994a), GluN2A ve GluN2B reseptör proteinlerinin yüksek yoğunlukta eksprese edildiği gösterilirken (Petralia ve ark., 1994b), GluN3A-B alt birimlerinin her iki çekirdeklerdeki ekspresyonunu gösteren herhangi bir veriye rastlanamamıştır (Doherty ve Sladek 2011). Eygör ve ark., (2001) tarafından in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak yapılan çalışmada, SON'deki kainat reseptör alt birimlerinin varlığı mRNA düzeyinde araştırılmış, GluK5'in çok yüksek GluK1'in düşük yoğunlukta eksprese edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, NMDA reseptör alt birimlerinden GluN1, GluN2B ve GluN2C'nin yüksek GluN2A ve GluN2D'nin orta yoğunlukta sinyali belirlenmiştir. AMPA reseptör alt birimlerinden GluA2'nin orta yoğunlukta GluA1 ve GluA3'ün düşük yoğunlukta eksprese edildiği gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları, supraoptik çekirdekte hem NMDA hem de non-NMDA glutamat reseptör proteinlerinin nesfatin-1 nöronlarınca sentezlendiğini gösterdi. İkili immünofloresan boyamayla kainat reseptör alt birimlerinden GluK5 ve GluK1/2/3'ün, AMPA reseptör alt birimlerinden GluA1 ve GluA2'nin, NMDA reseptör alt birimlerinden GluN1 ve GluN2A'nın ekspresyonu çoğu nesfatin-1

nöronunda belirlenirken GluA3 ve GluA4'ün varlığı sadece bir grup nesfatin-1 nöronunda gösterildi.

Glutamat reseptörleri aynı alt birimlerle homomerik, farklı alt birimlerle heteromerik reseptör kompleksleri oluşturarak fonksiyonel hale gelirler (Alt ve ark., 2004; Howe, 1996; Monyer ve ark., 1992) Çalışmamız sonucunda fonksiyonel reseptör kanalı oluşturabilecek tüm reseptör alt birimlerinin SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarınca sentezlendiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar nesfatin-1 nöronlarında tek başına kanal oluşturamayan GluK5 ile homomerik GluK1, GluK2 veya GluK3 birimlerinin bir araya gelerek fonksiyonel heteromerik kainat-seçici reseptörleri oluşturabileceğini ya da düşük afiniteli homomerik fonksiyonel alt birimlerin (GluK1, GluK2 ve GluK3) kainat reseptör kompleksi oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde nesfatin-1 nöronlarında eksprese edildiğini gösterdiğimiz GluA1 veya GluA2 alt birimleri kendi başlarına ya da birlikte bulunarak fonksiyonel AMPA-seçici glutamat reseptörü oluşturabilirler. Sonuçlar GluA1 veya GluA2 ile beraber heteromerik AMPA reseptörü oluşturabilecek GluA3 ve GluA4 alt birimlerinin de ekspresyonunu göstermiştir.

Önemli bir diğer bulgu NMDA reseptörlerinin “olmazsa olmaz” alt birimi olan GluN1 proteininin de nesfatin-1 nöronlarında sentezlendiğinin belirlenmesidir. Nesfatin-1 nöronları GluN1 alt birimi ile birlikte, GluN2A alt birimini de sentezlediklerine göre, bu iki birimin varlığında fonksiyonel NMDA-seçici glutamat reseptörü oluşturabilirler. Dolayısıyla reseptörlerin nesfatin-1 nöronlarında eksprese edildiklerinin belirlenmesi, bu nöronların glutamat tarafından direkt olarak regüle edilebileceğini düşündürmektedir.

Sunulan tez çalışmasıyla literatürde ilk olacak pek çok yeni veri elde edilmiştir;

1. Çalışmanın en önemli bulgusu, nesfatin-1 nöronlarının regülasyonunun glutamaterjik sistem tarafından düzenlenmesidir. Bu sonuç, besin alımını baskılayan nesfatin-1 nöronlarının aktive olması istenilen fizyopatolojik durumlarda bu agonistlerin kullanımını düşündürür.
2. Agonist etkilerinin uygun antagonistlerle baskılanabilmesi de, benzer yaklaşımla, nesfatin-1 nöronlarının baskılanması gereken durumlarda glutamat antagonistlerinin kullanımını gündeme taşıyabilir.
3. Nesfatin-1 nöronlarının, homomerik ya da heteromerik fonksiyonel reseptör kanalları oluşturabilecek glutamat reseptör alt birimlerini eksprese ettiği gösterilmiştir.
4. Endojen glutamatın, eksitatör bir nörotransmitter olarak, nesfatin-1 nöronlarındaki reseptörlerine bağlanarak bu nöronların besin alımını baskılayıcı fonksiyonları üzerinde düzenleyici etki gösterebileceği ve bu etkide erkek ile dişi denekler arasında cinsiyete bağlı farklı etkileşimlerin var olabileceği belirlenmiştir.
5. Nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonunda c-Fos, CREB ve STAT5 proteinlerinin ekspresyonunu gerektiren hücre içi yolakların kullanıldığı gösterilmiş, literatürde ilk kez nesfatin-1 nöronlarında fosforile CREB ve fosforile STAT5 proteinlerinin varlığı belirlenmiştir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, besin alımını baskılayıcı etkiye sahip nesfatin-1'i sentezleyen nöronların regülasyonunda rol oynayan glutamat agonistleri ve/veya antagonistlerinin besin alımı bozukluklarına yönelik farmakolojik çalışmalarda hedef mekanizma olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Adam CL, Archer ZA, Findlay PA et al (2002) Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology* 75: 250-256.

Ahima RS, Antwi DA (2008) Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 37: 811-823.

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

Alt A, Weiss B, Ogden AM et al (2004) Pharmacological characterization of glutamatergic agonists and antagonists at recombinant human homomeric and heteromeric kainate receptors in vitro. *Neuropharmacology* 46: 793-806.

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.

Amico JA, Morris M, Vollmer RR (2001) Mice deficient in oxytocin manifest increased saline consumption following overnight fluid deprivation. *The American Journal of Physiology* 281: 1368-1373.

Anand BK, Brobeck JR (1951) Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 77: 323-324.

Anubhuti AS (2006) Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity. *Neuropeptides* 40: 375-401.

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

Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M et al (2010) Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport* 21: 1008-1011.

Aydin S (2013) Role of NUCB2/nesfatin-1 as a possible biomarker. *Current Pharmaceutical Design* 19: 6986-6992.

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

Balla A, Koneru R, Smiley J et al (2001) Continuous phencyclidine treatment induces schizophrenia-like hyperre activity of striatal dopamine release. *Neuropsychopharmacology* 25: 157-164.

Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Gotz H et al (1994) Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 375: 497-512.

Bellinger LL, Bernardis LL (2002) The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiology and Behavior* 76: 431-442.

Bernardis LL, Bellinger LL (1996) The Lateral Hypothalamic Area Revisited: Ingestive Behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 20: 189-287.

Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26: 393-428.

Bettler B, Mulle C (1995) Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 34: 123-139.

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW (1997) Ca²⁺-dependent regulation in neuronal gene expression. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 419-429.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *Journal of Comparative Neurology* 319: 218-245.

Brailoiu GC, Deliu E, Tica AA et al (2013) Nesfatin-1 activates cardiac vagal neurons of nucleus ambiguus and elicits bradycardia in conscious rats. *Journal of Neurochemistry* 126: 739-748.

Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E et al (2007) Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148: 5088-5094.

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

Bromberg J, Chen X (2001) STAT proteins: Signal transducers and activators of transcription. *Methods in Enzymology* 333: 138-151.

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

Brown RSE, Piet R, Herbison AE et al (2012) Differential Actions of Prolactin on Electrical Activity and Intracellular Signal Transduction in Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* 153: 2375-2384.

Camilleri M (2015) Peripheral mechanisms in appetite regulation. *Gastroenterology* 148: 1219-1233.

Caquineau C, Leng G, Guan XMM et al (2006) Effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone on magnocellular oxytocin neurons and their activation at introduction in male rats. *Journal of Neuroendocrinology* 18: 685-691.

Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. *Trends 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.

Carola R, Harley JP, Noback CR (1990) In *Human Anatomy and Physiology*. 2nd edition, McGraw Hill, Inc, USA, pp: 740-741.

Chen X, Dong J, Jiang ZY (2012) Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regulatory Peptides* 177: 21-26.

Chou TC, Scammell TE, Gooley JJ et al (2003) Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *Journal of Neuroscience* 23: 10691-10702.

Collingridge GL, Olsen RW, Peters J et al (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5.

Colmers WF (2007) Less fat with nesfatin. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18: 131-132.

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* 25: 63-67.

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M et al (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.

Crespo CS, Cachero AP, Jiménez LP et al. (2014) Peptides and food intake. *Frontiers and Endocrinology* 58: 1-13.

Darnell JE (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.

Darnell JE, Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-Stat Pathways and Transcriptional Activation in Response to Ifns and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 264: 1415-1421.

Doherty FC, Sladek CD (2011) NMDA receptor subunit expression in the supraoptic nucleus of adult rats: Dominance of NR2B and NR2D. *Brain Research* 1388: 89-99.

Dong J, Guan HZ, Jiang ZY (2014) Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the dorsal vagal complex and inhibits food intake. *Plos one* 9: e98967.

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.

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.

Erecinska M, Silver IA (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Progress in Neurobiology* 35: 245-96.

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 Z, Cavusoglu I et al (2005) Localization of kainate receptor subunit GluR5-immunoreactive cells in the rat hypothalamus. *Molecular Brain Research* 136: 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 IM (2012) Glutamate and Orexin Neurons. *Vitamins and Hormones: Sleep Hormones* 89: 209-222.

Feijoo-Bandin S, Rodriguez-Penas D, Garcia-Rua V et al (2013) Nesfatin-1 in human and murine cardiomyocytes: synthesis, secretion and mobilization of Glut-4. *Endocrinology* 154: 4757-4767.

Ferguson AV, Samson WK (2003) The orexin/hypocretin system: a critical regulator of neuroendocrine and autonomic function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24: 141-50.

Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience* 31: 563-590.

Foo KS, Brauner H, Ostenson CG et al (2010) Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *Journal of Endocrinology* 204: 255-263.

Foo KS, Brismar H, Broberger C (2008) Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 156: 563-579.

Fort P, Salvat D, Hanriot L et al (2008) The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 155: 174-181.

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.

Funahashi H, Takenoya F, Guan JL et al (2003) Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anatomical Science International* 78: 123-138.

Gao Q, Horvath TL (2008) Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Letters* 582: 132-141.

Garcia-Galiano D, Navarro VM, Gaytan F et al (2010a) Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *Journal of Molecular Endocrinology* 45: 281-290.

Garcia-Galiano D, Navarro VM, Roa J et al (2010b) The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *Journal of Neuroscience* 30: 7783-7792.

Gereau RW, Swanson GT (2008) *The Glutamate Receptors*. Totowa NJ: Humana Press, pp: 1-99. ISSN: 978-1-58829-792-1.

Goebel M, Stengel A, Wang L et al (2009a) Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neuroscience Letters* 452: 241-246.

Goebel M, Stengel A, Wang L et al (2009b) Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Research* 1300:114-124.

Goebel M, Stengel A, Wang L et al (2011) Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides* 32: 36-43.

Goebel-Stengel M, Wang L, Stengel A et al (2011) Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research* 1396: 20-34.

Gonzalez R, Kerbel B, Chun A et al (2010) Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *Plos one* 5: e15201.

Gonzalez R, Perry RL, Gao X et al (2011) Nutrient responsive nesfatin-1 regulates energy balance and induces glucose-stimulated insulin secretion in rats. *Endocrinology* 152: 3628-3637.

Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S (2009) Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381: 643-648.

Gotoh K, Masaki T, Chiba S et al (2013) Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *Journal of Neurochemistry* 124: 90-99.

Gu GB, Rojo AA, Zee MC et al (1996) Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *Journal of Neuroscience* 16: 3035-3044.

Guyon A, Conductier G, Rovere C et al. (2009) Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides* 30: 2031–2039.

Hagan MM, Paul A, Rushing PA et al (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83-132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: 47-52.

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG et al (1998) Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience* 1: 271-272.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Koob GF (1998) Neuropeptide Y induced feeding and its control. *Vitamins and Hormones* 54: 51-66.

Herb A, Burnashev N, Werner P et al (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8: 775-785.

Hetherington AW, Ranson SW (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record* 78: 149-172.

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

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993) c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14: 173-213.

Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience* 17: 31-108.

Horvath TL, Andrews ZB, Diano S (2009) Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinology Metabolism* 20: 78-87.

Howe JR (1996) Homomeric and heteromeric ion channels formed from the kainate-type subunits GluR6 and KA2 have very small, but different, unitary conductances. *Journal of Neurophysiology* 76: 510-519.

Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S et al (2008) Desacylghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29: 2159-2168.

Inhoff T, Stengel A, Peter L et al (2010) Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides* 31: 257-262.

Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H et al (2012) Nesfatin-1 induces the phosphorylation levels of cAMP response element-binding protein for intracellular signaling in a neural cell line. *Plos one* 7: e50918.

Iwasaki Y, Nakabayashi H, Kakei M et al (2009) Nesfatin-1 evokes Ca²⁺ signaling in isolated vagal afferent neurons via Ca²⁺ influx through N-type channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390: 958-962.

Javitt DC, Balla A, Burch S et al (2004) Reversal of phencyclidine-induced dopaminergic dysregulation by N-methyl-D-aspartate receptor/glycine site agonists. *Neuropsychopharmacology* 29: 300-307.

Jean A, Conductier GG, Manrique C et al (2007) Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 16335-16340.

Kageyama K, Suda T (2010) Transcriptional Regulation of Hypothalamic Corticotropin-Releasing Factor Gene. *Hormones of the Limbic System* 82: 301-317.

- Kawashima T, Okuno H, Bito H (2014) A new era for functional labeling of neurons: activity-dependent promoters have come of age. *Frontiers in Neural Circuits* 8: 37.
- Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 140: 578-96.
- Kerbel B, Unniappan S (2012) Nesfatin-1 suppresses energy intake co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *Journal of Neuroendocrinology* 24: 366-377.
- 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 and Behavior* 42: 529-543.
- Kiskin NI, Krishtal OA, Tsyndrenko AY (1986) Excitatory amino acid receptors in hippocampal neurons: kainate fails to desensitize them. *Neuroscience Letters* 63: 225-230.
- 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.
- Konczol K, Pinter O, Ferenczi S et al (2012) Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *International Journal of Obesity* 36: 1514-1521.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP et al (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine in humans. *Psychotomimetic* 51: 199-214.
- Kwon MS, Seo YJ, Shim EJ (2006) The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience* 142: 1281-1292.
- Ladyman SR, Fieldwick DM, Grattan DR et al (2012) Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction* 144: 83-90.
- Lau J, Herzog H (2014) CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Frontiers in Neuroscience* 8: 313-31.

Lechan RM, Fekete C (2006) Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Peptides* 27: 310-325.

Lechan RM, Toni R (2016) *Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary*. Editor: DE GROOT LJ, *Endocrinology Book*. South Dartmouth, pp:1-204.

Legradi G, Holzer D, Kapcala KP et al (1997) Glucocorticoids inhibit stress-induced phosphorylation of CREB in corticotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 66: 86-97.

Lerma J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews* 4: 48-495.

Lester RAJ, Clements JD, Westbrook GL et al (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346: 565-567.

Levine AS, Billington CJ (1989) Opioids are they regulators of feeding? *Annals of the New York Academy Science* 575: 209-219.

Li HY, Hwang HW, Hu YH (2002) Functional characterizations of cocaine-and amphetamine-regulated transcript mRNA expression in rat hypothalamus. *Neuroscience Letters* 323: 203-206.

Lonze BE, Ginty DD et al (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-623.

Lubkin M, Stricker-Krongrad A (1998) Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253: 241-245.

Ma FY, Anderson GM, Gunn TD et al (2005) Prolactin specifically activates signal transducer and activator of transcription 5b in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Endocrinology* 146: 5112-5119.

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL et al (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321: 519-522.

Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S et al (2009) Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin independent melanocortin pathway. *Cell Metabolism* 10: 355-365.

Malarkey EB, Parpura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry International* 52: 142-154.

Marcus JN, Elmquist JK (2006) *The Orexin/Hypocretin System: Physiology and Pathophysiology*. Editor(ler): NISHINO S, SAKURAI T, *Orexin Projections and Localization of Orexin Receptors*. chapter 3, Humana Press, pp 21-43.

- Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE et al (1998) Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nature Medicine* 4: 718-721.
- Mayer J (1991) The glucostatic theory of regulation of food intake and the problem of obesity. *Nutrition Reviews* 49: 46-8.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309: 261-263.
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 599-609.
- McNulty S, Schurov IL, Sloper PJ et al (1998) Stimuli which entrain the circadian clock of the neonatal Syrian hamster in vivo regulate the phosphorylation of the transcription factor CREB in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *European Journal of Neuroscience* 10: 1063-1072.
- Merali Z, Cayer C, Kent P et al (2008) Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 201: 115-123.
- Merchenthaler I, Lane M, Shughrue P (1999) Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor Messenger RNAs in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 403: 261-280.
- 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.
- Miedlar JA, Rinaman L, Vollmer RR et al (2007) Oxytocin gene deletion mice overconsume palatable sucrose solution but not palatable lipid emulsions. *The American Journal of Physiology* 293: 1063-1068.
- Minbay FZ, Eyigor O, Cavusoglu I (2006) Kainic acid activates oxytocinergic neurons through non-NMDA glutamate receptors. *International Journal of Neuroscience* 116: 587-600.
- Miura K, Titani K, Kurosawa Y et al (1992) Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187: 375-380.
- Moghaddam B, Adams BW (1998) Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 281: 1349-1352.
- Mohan H, Unniappan S (2012) Ontogenic pattern of nucleobindin-2/nesfatin-1 expression in the gastroenteropancreatic tissues and serum of Sprague Dawley rats. *Regulatory Peptides* 175: 61-69.

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 29: 365-402.

Monaghan DT, Holets VR, Toy DW et al (1983) Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H-L-glutamate binding sites. *Nature* 306: 176-179.

Monyer H, Sprengel R, Herb A et al (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221.

Moreau JM, Ciriello J (2013) Nesfatin-1 induces Fos expression and elicits dipsogenic responses in subfornical organ. *Behavioural Brain Research* 250: 343-350.

Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34: 1219-1237.

Morley JE (1987) Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocrine Reviews* 8: 256-287.

Nakanishi S (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597-603.

Nakata M, Manaka K, Yamamoto S et al (2011) Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet beta-cells. *Endocrine Journal* 58: 305-313.

Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR (2004) Appetite regulation: from gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology* 60: 153-160.

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

Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2012) Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 100: 656-664.

Noetzel S, Stengel A, Inhoff T et al (2009) CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regulatory Peptides* 157: 84-91.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P et al (1984) Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurons. *Nature* 307: 462-465.

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

Ohmori J, Sakamoto S, Kubota H et al (1994) 6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H,4H)-quinoxalinedione hydrochloride (YM90K) and related compounds: structure-activity relationships for the AMPA type non-NMDA receptor. *Journal of Medicinal Chemistry* 37: 467-475.

Okere B, Xu L, Roubos EW et al (2010) Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Research* 1317: 92-99.

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

Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS et al (1991a) Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12: 113-118.

Olson BR, Drutarosky MD, Stricker EM et al (1991b) Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: Evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology* 129: 785-791.

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

Palasz A, Krzystanek M, Worthington J et al (2012) Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides* 46: 105-112.

Palmer CL, Cotton L, Henley JM (2005) The molecular pharmacology and cell biology of alpha amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacology Reviews* 57: 253-77.

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

Patil ST, Zhang L, Martenyi F et al (2007) Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nature Medicine* 13: 1102-1107.

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

Pedrazzini T, Seydoux J, Kunstner P et al (1998) Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nature Medicine* 4: 722-726.

Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994a) Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits KA2 and GluR6/7 in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *Journal of Comparative Neurology* 349: 85-110.

- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994b) The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *Journal of Neuroscience* 14: 6102-6120.
- Price CJ, Hoyda TD, Samson WK et al (2008a) Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 245-250.
- Price CJ, Samson WK, Ferguson AV (2008b) Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Research* 1230: 99-106.
- Price TO, Samson WK, Niehoff ML et al (2007) Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 28: 2372-2381.
- Prinz P, Goebel-Stengel M, Teuffel P et al (2016) Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 470: 521-527.
- Puryear R, Rigatto KV, Amico JA et al (2001) Enhanced salt intake in oxytocin deficient mice. *Experimental Neurology* 171: 323-328.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S et al (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380: 243-247.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE et al (2010) Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 151: 3169-3180.
- Ramos EJ, Meguid MM, Campos ACL et al (2005) A-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition* 21: 269-279.
- Riccardo D, Luka L, Hendrik L et al (2017) Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide. *Journal of Endocrinology* 232: 45-65.
- Richard D (1999) The role of corticotropin-releasing hormone in the regulation of energy balance. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 6: 10-19.
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG et al (1998) A-C-terminal fragment of agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of a-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-4431.
- Sabatier N, Caquineau C, Douglas AJ et al (2003) Oxytocin released from magnocellular dendrites: A potential modulator of alpha-melanocyte-stimulating hormone behavioral actions? *Annals of the New York Academy of Sciences* 994: 218-224.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328-1331.

Sakuma Y (2009) Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 410-414.

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.

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.

Sarkar S, Legradi G, Lechan RM (2002) Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research* 945: 50-59.

Satoh N, Ogawa Y, Katsura G et al. (1997) Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: Evidence for the loss of its satiety effect in the VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138: 947-954.

Schmidt PT, Naslund E, Gryback P et al (2003) Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regulatory Peptides* 116: 21-25.

Schwartz MW, Dallman MF, Woods SC (1995) Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 269: 949-957.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D et al (2000) Central nervous system control and food intake. *Nature* 404: 661-671.

Sears RM, Liu RJ, Narayanan NS et al (2010) Regulation of nucleus accumbens activity by the hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone. *Journal of Neuroscience* 30: 8263-8273.

Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M et al (2013) Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434: 434-438.

Seeburg PH (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neuroscience* 16: 359-365.

Serter S, Minbay Z, Eyigör Ö (2016) Açlık sonrası beslenme ile uyarılan nöronostatin nöronlarında pStat5 ve c-Fos ekspresyonunun araştırılması. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, Kongre kitabı, İzmir, Türkiye, Mayıs 2016.

Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ et al (1990) 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247: 571-574.

Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K et al (2009b) Peripheral Administration of Nesfatin-1 Reduces Food Intake in Mice: The Leptin-Independent Mechanism. *Endocrinology* 150: 662-671.

Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S et al (2009a) A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides*. 30: 995-998.

Shirasaka T, Kunitake T, Takasaki M et al (2002) Neuronal effects of orexins: relevant to sympathetic and cardiovascular functions. *Regulatory Peptides* 104: 91-95.

Simerly RB (2004) Anatomical Substrates of Hypothalamic Integration. Editor: PAXINOS G, *The Rat Nervous System*. Third Edition, Elsevier Academic Press, USA, pp: 336-337.

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

Sorensen LB, Moller P (2003) Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *International Journal of Obesity* 27: 1152-1166.

Stanley S, Wynne K, McGowan B et al (2005) Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiological Reviews* 85: 1131-1158.

Stengel A (2015) Nesfatin-1-More than a food intake regulatory peptide. *Peptides* 72: 175-183.

Stengel A, Goebel M, Wang L et al (2009a) Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 150: 4911-4919.

Stengel A, Goebel M, Wang LX et al (2010) Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: Role as regulators of food intake and body weight. *Peptides* 31: 357-369.

Stengel A, Goebel M, Yakubov I et al (2009b) Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 150: 232-238.

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

Stengel A, Taché Y (2013) Role of NUCB2/Nesfatin-1 in the Hypothalamic Control of Energy Homeostasis. *Hormone and Metabolic Research* 45: 975-979.

- Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG (2005) Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neuroscience Letters* 387: 80-84.
- Takayanagi Y, Kasahara Y, Onaka T et al (2008) Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity. *Neuroreport* 19: 951-955.
- Tang CM, Dichter M, Morad, M et al (1989) Quisqualate activates a rapidly inactivating high conductance ionic channel in hippocampal neurons. *Science* 243: 1474-1477.
- Tang-Christensen M, Larsen P, Göke R et al (1996) Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 271: 848-856.
- Tang-Christensen M, Romer J, Larsen PJ et al (2000) The proglucagon derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nature Medicine* 6: 802-807.
- Toni R, Malaguti A, Benfenati F et al (2004) The human hypothalamus: A morpho-functional perspective. *Journal of Endocrinological Investigation* 27: 73-94.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ et al (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews* 62: 405-96.
- Trussell LO, Thio LL, Zorumski CF et al (1988) Rapid desensitization of glutamate receptors in vertebrate central neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 2834-2838.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-38.
- Umbricht D, Schmid L, Koller R et al (2000) Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 57: 1139-1147.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 18: 158-168.
- Vale W, Speiss J, Rivier C et al (1981) Characterization of a 41-amino acid residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and endorphin. *Science* 213: 1394-1397.
- 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, Hermans-Borgmeyer I, Hofer M et al (1994) Ionotropic glutamate-receptor gene expression in hypothalamus: localization of AMPA kainate and NMDA receptor RNA with in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology* 343: 428-444.
- Van den Pol AN, Yao Y, Fu LY et al (2009) Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *Journal of Neuroscience* 29: 4622-4639.
- Van den Top M, Lee K, Whyment AD et al (2004) Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature Neuroscience* 7: 493-494.
- Vrang N, Phifer CB, Corkern MM et al (2003) Gastric distension induces c-Fos in medullary GLP-1/2-containing neurons. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285: 470-478.
- Wernecke K, Lamprecht I, Jöhren O et al (2014) Nesfatin-1 increases energy expenditure and reduces food intake in rats. *Obesity* 22: 1662-1668.
- Williams G, Bing C, Cai XJ et al (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiology and Behavior* 74: 683-701.
- Williams G, Cai XJ, Elliot JC et al (2004) Anabolic neuropeptides. *Physiology and Behavior* 81: 211-222.
- Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *Journal of Neuroscience* 13: 3582-3598.
- Wisialowski T, Parker R, Preston E et al (2000) Adrenalectomy reduces neuropeptide Y-induced insulin release and NPY receptor expression in the rat ventromedial hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation* 105: 1253-1259.
- Xu B, Goulding EH, Zang K et al (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience* 6: 736-742.
- Yang SC, Shieh KR, Li HY (2005) Cocaine-and amphetamine-regulated transcript in the nucleus accumbens participates in the regulation of feeding behavior in rats. *Neuroscience* 133: 841-851.
- Yosten GL (2013) Novel neuropeptides in the control of food intake: Neuronostatin and Nesfatin-1. *Vitamins and Hormones* 2: 1-25.

Yosten GLC, Samson WK (2009) Nesfatin-1 exerts cardiovascular effects in brain: Possible interaction with the central melanocortin system. *The American Journal of Physiology* 297: 330-336.

Yu JH, Kim MS (2012) Molecular Mechanisms of Appetite Regulation. *Diabetes and Metabolism Journal* 36: 391-398.

Zhang AQ, Li XL, Jiang CY et al (2010) Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World Journal of Gastroenterology* 16: 1735-1741.

Zhang Z, Li L, Yang M et al (2012) Increased plasma levels of nesfatin-1 in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 120: 91-95.

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

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

- 3v:** Üçüncü ventrikül
aa: Aminoasit
ABC: Avidin biyotin kompleksi
ACTH: Adrenokortikotropik hormonun
AgRP: Agouti-İlişkili Peptit
AMPA: α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol proprionik asit
Aq: Aqueduct
AR: Antijen Retrieval
ARC: Arkuat çekirdek
BDNF: Beyin-türevli nörotrofik faktör
Ca²⁺: Kalsiyum
CART: Kokain- ve Amfetamin-Düzenleyici Transkript
CCK: Kolesistokinin
CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CREB: c-AMP-yanıtlı element bağlayıcı protein
CRF: Kortikotropin-salıverici faktör
CRH: Kortikotropin-salgılatıcı hormon
DAB: Diaminobenzidin
dH₂O: Distile su
DMH: Dorsomedial hipotalamus
DMN: Dorsomedial çekirdek
DRG: Dorsal kök gangliyonu
DVC: Dorsal vagal kompleks
EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit disodyum
EW: Edinger-Westphal çekirdeği
f: Forniks
GHRH: Büyüme hormonunu salgılayıcı hormon
GLP-1: Glukagon-benzeri peptit-1
GLP-2: Glukagon-benzeri peptit-2
GluA: AMPA reseptörleri
GluK: Kainat reseptörleri
GluN: NMDA reseptörleri
H⁺: Hidrojen
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HCl: Hidroklorik asit
İcv: intraserebroventriküler

İp: intraperitoneal
K⁺: Potasyum
Kainat: 2-karboksi-3-karboksimetil-4-izopropenilpirolidin
LHA: Lateral hipotalamik alan
MC3R: Melanokortin-3 reseptörü
MC4R: Melanokortin-4 reseptörü
MCH: Melanin konsantre edici hormon
Mg²⁺: Magnezyum
MK801: Dizolcilpine
MRG: Magnetik rezonans görüntüsü
mRNA: Mesajcı RNA
MSS: Merkezi sinir sistemi
Na⁺: Sodyum
NaCl: Sodyum Klorür
NaOH: Sodyum hidroksit
NEFA: DNA bağlayıcı /EF-hand/ asidik aminoasit açısından zengin bölge
Ni: Nikel
NMDA: N-metil-D-aspartat
NPY: Nöropeptid Y
NTS: Soliter Traktus Çekirdeği
NUCB: Nükleobindin
OK: Optik kiazma
OS: Oda sıcaklığı
OXM: Oksintomodülin
OXY: Oksitosin
PC: Prohormon konvertaz
PCP: Fensiklidin
pCREB: Fosforile CREB
PeV: Periventriküler çekirdek
PFA: Perifornikal alan
PKA: Protein kinaz A
POMC: Pro-opiomelanokortin
PPAR γ : Peroksizom-proliferatörü ile aktive olan reseptör
pSTAT: Fosforile STAT
PVN: Paraventriküler çekirdek
PYY: Peptit YY
SHU9119: Melanokortin-3/4 reseptör antagonisti
SP: Sinyal peptiti
STAT: Sinyal çevrimcileri ve transkripsiyon aktivatörleri
TRH: Tirotropin-salgılatıcı hormon
VMH: Ventromedial hipotalamus
VMN: Ventromedial çekirdek
Zn²⁺: Çinko
 α -MSH: α -melanosit uyarıcı hormon

8. EKLER

8.1. Şekil Listesi

Şekil 1. Hipotalamusun magnetik rezonans görüntüsü ve anatomik lokalizasyonu

Şekil 2. Hipotalamik zonlar ve bölgeler

Şekil 3. Yeme davranışının düzenlenmesinde yer alan ana yolakların şematik gösterimi

Şekil 4. Besin alımı ve enerji homeostazının regülasyonunda etkili olan nöropeptitler, hipotalamik çekirdekler ve ilişkili yolaklar

Şekil 5. NUCB2 proteini ve nesfatin-1'in yapısı

Şekil 6. İkili indirekt immünoperoksidaz işaretleme protokolünün şematize edilmiş hali

Şekil 7. İkili immünofloresan işaretleme protokolünün şematize edilmiş hali

Şekil 8. İmmünohistokimyasal işaretlemelerin genel sonuçları

Şekil 9. Nesfatin-1-pozitif nöronların dişi sıçan hipotalamik çekirdeklerdeki dağılımı

Şekil 10. Nesfatin-1 nöronlarındaki pCREB ekspresyonu

Şekil 11. Agonist uygulamasının perifornikal alan ve SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarına etkisi

Şekil 12. Agonist uygulamasının SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarındaki fosforile-STAT5 ekspresyonuna etkisi

Şekil 13. Agonist uygulamasının periventriküler çekirdekte yerleşik nesfatin-1 nöronlarında pSTAT5 ekspresyonuna etkisi

Şekil 14. Dişi deneklerde, agonist uygulaması ile aktive olmuş SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının görünümü

Şekil 15. Erkek deneklerde, agonist uygulaması ile aktive olmuş SON'de yerleşik nesfatin-1 nöronlarının görünümü

Şekil 16. Dişi deneklerde ARC'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi

Şekil 17. Erkek deneklerde ARC'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi

Şekil 18. Dişi deneklerde PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi

Şekil 19. Erkek deneklerde PVN'de lokalize nesfatin-1 nöronlarına agonistlerin etkisi

Şekil 20. SON'de glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması

Şekil 21. ARC'de glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması

Şekil 22. PVN'de glutamat agonistleri kainik asit, AMPA ve NMDA etkilerinin birbirleriyle karşılaştırılması

Şekil 23. Cinsiyete göre agonist (kainik asit, AMPA ve NMDA) etkilerinin karşılaştırılması

Şekil 24. Dişi deneklerde, SON'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi

Şekil 25. Erkek deneklerde, SON'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi

Şekil 26. Dişi deneklerde, ARC'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi

Şekil 27. Erkek deneklerde, ARC'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi

Şekil 28. Dişi deneklerde, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi

Şekil 29. Erkek deneklerde, PVN'deki nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna glutamat antagonistlerinin etkisi

Şekil 30. SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında GluK5 reseptör proteini ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü

Şekil 31. SON'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında GluK1/2/3 reseptör proteini ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü

Şekil 32. ARC'de lokalize nesfatin-1 nöronlarında GluK1/2/3 reseptör proteini ekspresyonunun immünofloresan görüntüsü

Şekil 33. SON’de nesfatin-1 nöronlarında GLUA1 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 34. SON’de nesfatin-1 nöronlarında GLUA2 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 35. SON’de nesfatin-1 nöronlarında GLUA3 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 36. SON’de nesfatin-1 nöronlarında GLUA4 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 37. SON’de nesfatin-1 nöronlarında GluN1 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 38. PVN’de nesfatin-1 nöronlarında GluN1 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 39. Lateral hipotalamusta nesfatin-1 nöronlarında GluN1 reseptör proteini ekspresyonu

Şekil 40. Lateral hipotalamusta ikili immünofloresan işaretli GluN1 içeren nesfatin-1 nöronlarının büyük büyütme ile görünümü

Şekil 41. SON’de nesfatin-1 nöronlarında GluN2A reseptör proteini ekspresyonu

8.2. Tablo Listesi

Tablo 1. Besin alımı ve enerji homeostazının regülasyonunda etkili olan majör nöropeptitler

Tablo 2. Tez çalışması kapsamında kullanılan primer antikorların isimleri

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

Tablo 4. Çalışmada kullanılan glutamat reseptör agonist ve antagonistlerinin gruplandırılmaları

Tablo 5. Dişi sıçanların supraoptik çekirdeklerinde lokalize olan nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Tablo 6. Erkek sıçanların supraoptik çekirdeklerinde lokalize olan nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Tablo 7. Dişi sıçanların arkuat çekirdeklerinde lokalize olan nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Tablo 8. Erkek sıçanların arkuat çekirdeklerinde lokalize olan nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Tablo 9. Dişi sıçanların paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu

Tablo 10. Erkek sıçanların paraventriküler çekirdeklerinde lokalize olan nesfatin-1 nöronlarındaki c-Fos ekspresyonu



9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve akademik tecrübesiyle bana daima yol gösteren, yanında çalışmaktan onur duyduğum, hoşgörü ve bilgisiyle bana her zaman destek olan, tezimin her aşamasında özverisini, zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Özhan Eyigör'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim ve tezimin hazırlanması sürecinde değerli katkı ve yönlendirmelerini gördüğüm, tecrübe ve bilgisinden sınırsızca yararlandığım, göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli hocam Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Zehra Minbay'a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında ilgi ve desteğini hiç esirgemeyen, bilimselliği ve çalışkanlığıyla bana her zaman örnek olan değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Semiha Ersoy'a; eğitimim sürecinde bilgi, birikim ve deneyimlerini cömertçe paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Şahin A. Sırmalı, Prof. Dr. Zeynep Kahveci, Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu ve Doç. Dr. Berrin Avcı'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında deneysel aşamalarda yardımcıları ve desteği için Uzm. Dr. Sema Serter Koçoğlu'na ve her zaman yanımda olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Dalı'ndaki asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Engin sabır ve hoşgörülerini ile ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını benden hiç esirgemeyen, hayatıma renk katan arkadaşlarım Dr. Zülfiye Gül ve Araş. Gör. Işıl Ezgi Eryılmaz'a teşekkür ederim

Çalışma bütçesinin tamamını karşılayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Varlıkları ile kendimi şanslı ve güvende hissetmemi sağlayan, her türlü konuda yanımda olarak beni cesaretlendiren canım eşime ve aileme, ayrıca tezimin deney aşamasında içimde atan kalbiyle, yazım aşamasında klavyemdeki parmaklarıyla yanımda olan canım oğlum Göktürk Alp'e kucak dolusu teşekkürler...

10. ÖZGEÇMİŞ

18 Mart 1984 yılında Denizli’de doğmuştur. İlk ve orta öğrenimini Bekilli 30 Ağustos ilköğretim okulunda, lise öğrenimini Denizli Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nde tamamlamıştır. 2003 yılında kazandığı Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü 2007 yılında bölüm ikincisi olarak tamamlamıştır. 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamış, 2011 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Almanya-Nagold Gençlik Merkezi Öğrenci Değişim Programını kazanmıştır. 2012 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamış, 2013 yılında Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na araştırma görevlisi olarak atanmıştır.

YAYINLARI:

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

- A1.** Satiroglu-Tufan N.L., Dodurga Y., **Gok Yurtseven D.**, Cetinkaya A., Feitelson M.A., RNA interference-mediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells. *Genetics and Molecular Research*, 9 (3): 1557-1567 vol 9-3gmr872, 2010.
- A2.** Kocamaz E., **Gok Yurtseven D.**, Cetinkaya A., Tufan A.C., Implication of C-type natriuretic peptide-3 signaling in glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte hypertrophy during TGF-beta1 induced chondrogenic differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Molecular Histology*, 43: 497-508, 2012.
- A3.** **Gok Yurtseven D.**, Abban-Mete G., Dodurga Y., Satiroglu-Tufan N.L., Differential expression and localization of Nanog, Oct 3/4 and C-kit in mouse ovarian tissue according to age. *Kuwait Medical Journal* 2017; 49 (1): 29-39.
- A4.** Minbay F. Z., Serter S., **Gok Yurtseven D.**, Eyigör O., Immunohistochemical localization of ionotropic glutamate receptors in the rat red nucleus. *Bosn J Basic Med Sci.* 2017: 17(1): 29-37.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

B1. Dursun B.,Abban G.,Kucukatay V.,Tufan L.,Dodurga Y.,Guclu A., **Gok Yurtseven D.**, High dose N-acetylcysteine is protective against cisplatin-induced acute kidney injury in rats: An effect through altered oxidative stress, caspase signalling and VEGF expression in the kidney. Prague (Czech Republic) Sa066 2011.

B2. Gürün M.S.,Yücel Özbölük H. Bağdaş D., **Gok Yurtseven D.**, Eyigör Ö., Antihyperalgesic effect of intra-amygdala injected CDP-choline in neuropathic pain models. Washington, DC, USA 730. 03 2014.

B3. Eyigör Ö., **Gok Yurtseven D.**, Minbay F. Z., Nesfatin-1 is Co-Expressed in GnRH and Orexin-A Neurons of Rat Hypothalamus. Rio de Janeiro, Brazil, 2015.

B4. **Gok Yurtseven D.**, Minbay F.Z., Eyigör Ö., Non-Nmda Glutamate Agonists Induce Sexually Dimorphic c-Fos Expression In Nesfatin Neurons In The Supraoptic Nucleus of Rat Hypothalamus. Rio de Janeiro, Brazil, 2015.

B5. Gürün M.S., Gürbüzöglü-Ulkan MK Bağdaş D., **Gok Yurtseven D.**, Eyigör Ö., The contribution of Nucleus Raphe Magnus to the analgesia produced by centrally administered CDP-choline. Chicago, ABD 705.20/S1 2015.

B6. **Gok Yurtseven D.**, Minbay F. Z., Eyigör Ö., Immunohistochemical Assessment of Direct Communication between Orexin and Nesfatin Neurons. Antalya-Turkey, 412-2017.

C. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

C1. **Gok Yurtseven D.**, Abban G., Expression and localization of embryonic stem cell markers; SSEA-1, Oct-3 and Nanog in adult Mouse endometrium. Çeşme (İzmir), No:1, (S:81) 2, 2010.

C2. Dursun B.,Abban G., Küçükataş V., Tufan L., Dodurga Y., Güçlü A., **Gök Yurtseven D.**, Gündoğdu G., Ratlarda yüksek doz N-asetilsisteinin sisplatin aracılı akut böbrek hasarına karşı koruyuculuğu: Oksidatif stres, Caspase sinyal Yolakları ve VEGF ekspresyonunun etkisi. Antalya, S 012, 2011.

C3. Dursun B., Tufan L., Abban-Mete G., Küçükataş V., Dodurga Y., Güçlü A., Gündoğdu G., **Gök Yurtseven D.**, Ratlarda Sisplatin-Aracılı Akut Böbrek Hasarına Karşı Darbopoietinin Kısmi Koruyuculuğunda Caspase Sinyal Yolakları, Oksidatif Stres ve VEGF'in Etkisi Antalya 138 V:20 No:3 2011.

C4. Abban Mete G., Oruç H., Mete E., **Gok Yurtseven D.**, Immunohistochemical Detection of Tra-1-60, Tra-1-81, Stro-1, CD34, CD73, CD105 Expression in Mouse Endometrium Pamukkale Üniversitesi (Denizli) 144-3, 2012.

C5. Yücel Özbölük YÜCEL H., Bağdaş D., **Gök Yurtseven D.**, Gürbüzöğlü K.M., Gürün M.S., Nöropatik Ağrı Modelinde Amigdala'ya Uygulanan CDP-Kolin'in Analjezik Etkisinin Tanımlanması Antalya 328 P-145, 2013.

C6. Özbölük HY., Bağdaş D., **Gök Yurtseven D.**, Aydın S., Eyigör Ö., Gürün M.S., Nöropatik ağrı modelinde Amigdala'ya uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinin tanımlanması. Uludağ Üniversitesi III. Bilgilendirme ve Ar-Ge Günleri Bursa, Türkiye 317 2013.

C7. **Gök Yurtseven D.**, Eyigör Ö., Nesfatin Nöronlarında Glutamat Agonistlerinin Aktive Edici Etkisinin Gösterilmesi Ankara 183 P-179 2014.

C8. Ülkan KM., **Gök Yurtseven D.**, Aydın S., Eyigör Ö., Gürün M.S., Serebral ventriküle uygulanan CDP-kolin'in analjezik etkisinde nukleus rafe magnusun rolü. Ankara, Türkiye 338-339 2015.

C9. **Gök Yurtseven D.**, Eyigör Ö., Paraventriküler Çekirdekte Yerleşik Anoreksijenik Nesfatin-1 Nöronlarının İyonotropik Glutamat Reseptör Aracılı Aktivasyonu Ankara S50-S51 Volume 10 Supplement 1, 2016.

C10. **Gök Yurtseven D.**, Eyigör Ö., Nesfatin Nöronlarında Glutamat Reseptörlerinin Varlığının Agonist Etkileri ve Reseptör Ekspresyonu Düzeyinde Araştırılması. Assessment of the Presence of Glutamate Receptors in Nesfatin Neurons through the Agonist Effects and Receptor Expression. İzmir/Çeşme 58:S02 2016.

C11. Uygul Kıymet Z., **Gök Yurtseven D.**, Eyigör Ö., Non-Pregangliyonik Edinger-Westphal Çekirdeğinin Besin Alımı Üzerine Etkisinde Glutamatın Düzenleyici Rolü İzmir/Çeşme 217:P024 2016.

PROJELERİ:

Abban G., **Gök Yurtseven D.**, Ovaryum Dokusunda Kök Hücre Varlığının Araştırılması, PAÜ BAP Projesi 2009-2011 (Araştırmacı).

Eyigör Ö., Minbay F. Z., **Gök Yurtseven D.**, Nesfatin ve oreksin etkileşimi: Besin alımını kontrol eden peptiderjik sistemlerin regülasyonunda yer alan faktörlerin immünohistokimyasal olarak araştırılması. 13S377 numaralı TÜBİTAK 1001 Projesi, 2014-2016 (Bursiyer).

ÖDÜLLERİ:

Tezcan B., Serter S., **Gok Yurtseven D.**, Çetinkaya A., Kıter E., Tufan A.C., Bilimsel araştırma ikincilik ödülü, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği 2010.

Dursun B., Abban G., Küçükataş V., Tufan L., Dodurga Y., Güçlü A., **Gok Yurtseven D.**, Gündoğdu G., Sözlü Bildiri Birincilik Ödülü Türk Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Derneği, 2011.

Gok Yurtseven D., Minbay F.Z., Eyigör O., En iyi sözlü bildiri birincilik ödülü, Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, 2016.

BİLİMSEL VE MESLEKİ KURULUŞLARA ÜYELİKLERİ:

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, üye (2009-halen)

